学 位 の 種 類	博士（薬学）
報 告 番 号	甲第１６４９号
学 位 記 番 号	第３３２号
氏 名	後藤　佳奈
授 与 年 月 日	平成 30 年 3 月 26 日
学位論文の題名	メチルマロン酸血症およびプロピオン酸血症の代謝酵素活性測定法の確立と患者における酵素活性測定
論文審査担当者	主査：　松永 民秀 副査：　木村 和哲，林 秀敏，青山 峰芳

名古屋市立大学学位論文

メチルマロン酸血症およびプロピオン酸血症の代謝酵素活性測定法の確立と患者における酵素活性測定

平成 29 年度 (2018 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医療機能薬学専攻

病院薬剤学分野

後藤　佳奈

① 本論文は 2018 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査　松永　民秀　教授
副査　林　　秀敏　教授
　　　青山　峰芳　教授
　　　木村　和哲　教授

② 本論文は学術情報雑誌に収載された次の報文を基礎とするものである。

1. K. Gotoh, Y. Nakajima, G. Tajima, Y. Hotta, T. Kataoka, Y. Kawade, N. Sugiyama, T. Ito, K. Kimura and Y. Maeda: Assay for methylmalonyl coenzyme A mutase activitybased on determination of succinyl coenzyme A by ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **18**, 5281-5286 (2015)

2. K. Gotoh, Y. Nakajima, G. Tajima, Y. Watanabe, Y. Hotta, T. Kataoka, Y. Kawade, N. Sugiyama, T. Ito, K. Kimura and Y. Maeda: Determination of methylmalonyl coenzyme A by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for measuring propionyl coenzyme A carboxylase activity in patients with propionic acidemia.
J. Chromatogr. B., **1046**, 195-199 (2017)

③ 本論文の基礎となる研究は、木村和哲教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

略語

CoA	coenzyme A
CV	coefficient of variation
ESI	electrospray ionization
GC	gas chromatography
MS	mass spectrometry
HPLC	high-performance liquid chromatography
UV	ultraviolet
IS	internal standard
MCM	methylmalonyl-CoA mutase
MMA	methylmalonic acidemia
MRM	multiple-reaction-monitoring
PA	propionic acidemia
PBS	phosphate buffered saline
PCC	propionyl-CoA carboxylase
UPLC	ultra high-performance liquid chromatography

【背景】

先天性代謝異常症は、特定の代謝酵素が生まれつき欠損または活性低下することにより、体内に増加する物質が様々な症状を引き起こす疾患である。現在、100 種類以上あると言われており、有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症など代謝障害の種類により分類される (Fig. 1) 。メチルマロン酸血症 (methylmalonic acidemia; MMA) とプロピオン酸血症 (propionic acidemia; PA) は、有機酸代謝異常症に分類される常染色体劣性遺伝疾患であり、日本国内における MMA の頻度は 1/11 万人、PA の頻度は 1/5 万人と言われている[1)]。

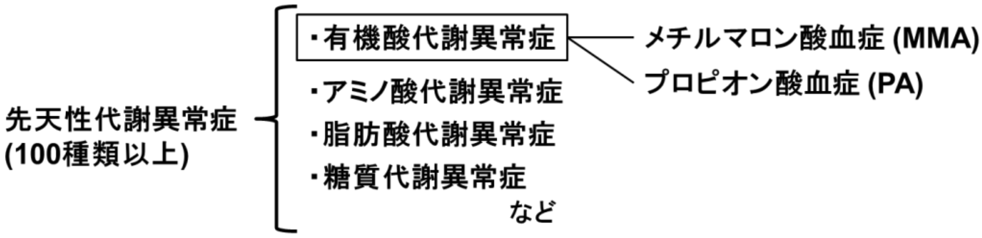


Fig. 1 先天性代謝異常症の分類

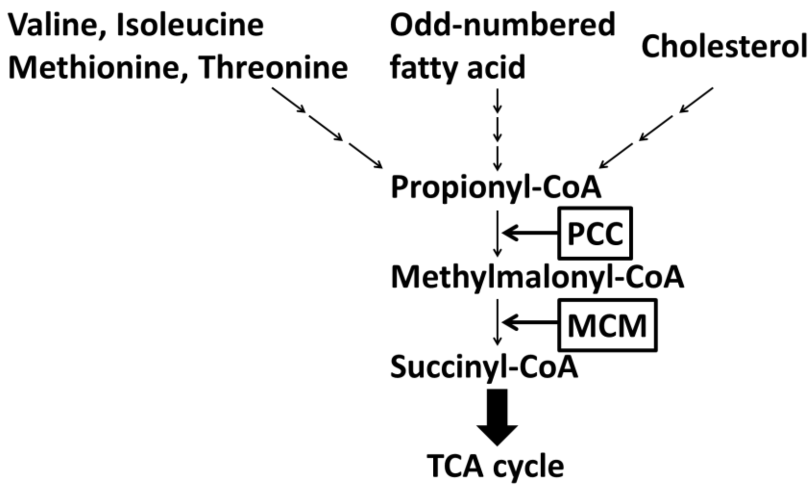


Fig. 2 分枝鎖アミノ酸、奇数鎖脂肪酸、コレステロールの代謝経路
(PCC; プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ)
(MCM; メチルマロニル-CoA ムターゼ)

バリン、イソロイシン、メチオニン、スレオニン、奇数鎖脂肪酸、コレステロールは、体内で propionyl-coenzyme A (propionyl-CoA) へと代謝され、プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (propionyl-CoA carboxylase; PCC) の働きでメチルマロニル-CoA へと代謝される (Fig. 2) 。さらに、メチルマロニル-CoA は、

メチルマロニル-CoA ムターゼ (methylmalonyl-CoA mutase; MCM) によりサクシニル-CoA へと代謝され、TCA 回路に取り込まれエネルギー産生に利用される。

MMA は、MCM の活性低下、または MCM の補酵素であるアデノシルコバラミンの欠乏[2)]により、メチルマロニル-CoA およびプロピオニル-CoA が体内に蓄積し、メチルマロン酸やプロピオン酸を発生する疾患である[3, 4)]。PA は、PCC の活性低下を原因とする疾患で、プロピオニル-CoA が体内に蓄積しプロピオン酸を発生する。MMA や PA の典型的な症状は、嘔吐、痙攣発作、精神発達遅滞、意識障害などであり、PA では幻視や心筋症を発症する例も報告されている[5, 6)]。MMA や PA は重症の場合には適切な治療を行わなければ死に至る疾患である[7-12)]。

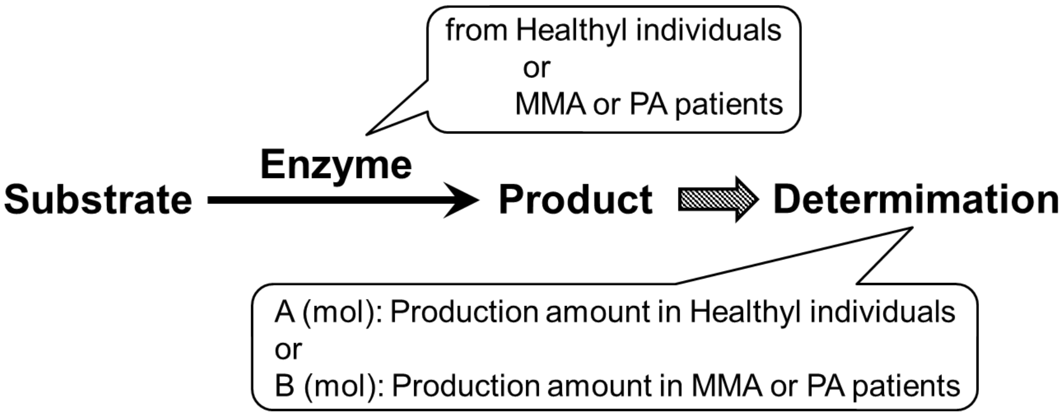
MMA や PA の患者は、アミノ酸などの代謝に障害があるため、出生後に母乳やミルクによりタンパク質などの摂取を開始すると、アシドーシスや高アンモニア血症を発症する。よって、MMA や PA は発症前に発見し、タンパク制限やカルニチン投与など適切な治療を行うことで健常人と同様の生活を送ることが期待できる疾患である。

新生児マススクリーニングは代謝異常症を発症前に発見するための検査である[13-16)]。本邦では、1977 年からフェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成、ガラクトース血症の 6 種の疾患を対象とするスクリーニングが行われている。1990 年に Millington らは、血中アシルカルニチン濃度をタンデム質量分析計 (MS/MS) で測定する新たなスクリーニング法 (MS/MS 法) を開発し、MMA および PA を含めた約 25 種類の代謝異常症を発見できるようになった[16)]。本邦でも 2014 年より全国で MS/MS 法によるスクリーニングが開始されている[17)]。スクリーニングで陽性となった場合は、診断を確定するために尿中有機酸分析などの二次検査を行うと同時に[18)]、カルニチン投与やタンパク制限などの治療・管理を行い、発症を予防する。

MS/MS 法が導入されて以降、発症前に MMA 患者や PA 患者が発見されたが、その中にスクリーニング導入前には嘔吐痙攣などの症状を発症しない (患者だと診断されなかった) 軽症患者 (無症状例) が含まれていた。スクリーニングで発見された患者は食事制限を含めた治療を開始するが、軽症の場合には厳重な食事制限は必要ないと考えられる。食事制限の有無は患者の QOL に影響するため、重症度があらかじめ判別できれば、カルニチン投与量などの治療方針やタンパク制限量を決定でき、患者の QOL の向上につながると期待できる。しかし、これまでのスクリーニングの結果から、スクリーニングにおけるマーカー物質 (MMA や PA においてはプロピオニルカルニチン) の濃度と重症

度とは相関せず、二次検査における尿中有機酸分析でも明確に重症度は判別できない。これは、栄養摂取量により左右されるものだからである。MMA や PA の発症原因となるメチルマロニル-CoA やプロピオニル-CoA の蓄積量を正確に定量できれば、その数値から重症度を判別できるかもしれない。しかし、メチルマロニル-CoA やプロピオニル-CoA は細胞内の物質であり、簡便に測定することは難しい。このように、体内に蓄積する物質から重症度を判別することは困難であるため、重症度を判別できる検査法が望まれる。

先天性代謝異常症は代謝酵素をコードする遺伝子変異を原因とするが、患者ごとで遺伝子の変異箇所が異なっている。そのため酵素活性に違いが生じ、重症度に差が現れる。酵素活性値は患者の状態や治療方法に左右されないため、疾患の重症度を明確に判別できると考えられる。酵素活性測定法の一つとして、健常人または患者から得た酵素を触媒とした酵素反応を行い、生成物の生成量を比較する方法が用いられている (Fig. 3) 。



$$\text{Enzyme activity of MMA or PA patients (\%)} = \frac{\text{B (mol)}}{\text{A (mol)}} \times 100$$

Fig. 3 代謝酵素活性測定法の基本原理

これまでに報告された MCM や PCC の活性測定法では、酵素反応に利用する酵素は皮膚線維芽細胞[19-21]や肝細胞[22]、腎細胞[23]から得ていた。しかし、皮膚生検や肝生検は患者負担が大きい事に加え、得られた細胞の培養に数日を要する。反応生成物の定量法としては、放射性同位体 ([^{14}C]) でラベルした基質を利用する方法や[23]、高速液体クロマトグラフィー / 紫外吸光度検出器 (high-performance liquid chromatography / ultraviolet; HPLC / UV) で定量する方法[24]が報告された。しかし、放射性同位体の利用には安全管理が必要であり、基質の入手が困難である。HPLC / UV での定量は、検出感度が低いため、生成物が検

出できない場合があるなどといった問題がある。これらのことから、MMA 患者や PA 患者の重症度判別のための酵素活性測定は行われておらず、簡便で低活性まで測定出来る方法が望まれている。

先天性代謝異常症の内、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症やメープルシロップ尿症の酵素活性測定を、末梢血リンパ球から得た酵素を用いて行った報告がある [25, 26]。リンパ球は採血のみで得られるため、患者負担を小さくし、細胞培養が不要であるため迅速に酵素活性を測定できる。よって本研究では MMA と PA の酵素反応を行うためにリンパ球に着目した。また、生成物の定量には、超高速液体クロマトグラフィー (ultra high-performance liquid chromatography; UPLC) と、UV よりも検出感度の高い MS/MS を組み合わせた装置である UPLC-MS/MS を利用することで、低活性値まで測定出来ると考えた。

以上から、本研究では、リンパ球を利用して酵素反応を行い、生成物を UPLC-MS/MS で定量する、MMA および PA の代謝酵素活性測定法を確立すること、さらに、開発した酵素活性測定法を利用して MMA 患者や PA 患者の MCM および PCC 活性値を測定し、活性値から重症度の判別が可能であるか確認することを目的とした。遺伝子変異が判明している患者に関しては、変異と重症度との関連も検討する。

Ⅰ. MMA および PA の代謝酵素活性測定法の確立

Fig. 3 で示した方法で MCM および PCC の酵素活性を測定するため、始めにサクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA を UPLC-MS/MS を用いて定量する方法を確立する。その後、末梢血リンパ球を用いた酵素反応の最適な反応条件を検討する。

【実験および方法】

1. サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS による定量法の確立

1. 1. 試薬と装置

Methylmalonyl-CoA tetralithium salt hydrate、succinyl-CoA sodium salt、propionyl-CoA lithium salt、acetyl-CoA sodium salt、adenosylcobalamin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。$NaHCO_3$、$MgCl_2$、K_2HPO_4、$HClO_4$ は Wako (Tokyo, Japan) から購入した。Tris-sulfate buffer (pH 7.5)は、Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Wako, Japan) と硫酸を用いて作製した。Adenosine 5-triphosphate disodium salt (ATP) は Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan) で購入した。VP-050 ultrasonic homogenizer (TAITEC; Saitama, Japan) はリンパ球の超音波破砕に用いた。BD Vacutainer CPT (Cell Preparation Tube with Sodium Citrate; Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, NJ, USA) とチュルク液 (Turk Solution; Wako; Japan) および血球計算盤 (Erma; Japan) はリンパ球分離に用いた。

1. 2. UPLC-MS/MS 装置

UPLC-MS/MS は、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) とタンデム質量分析計 (MS/MS) を組み合わせた装置である (Fig. 4) 。サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA を定量するため、UPLC と MS/MS それぞれの測定条件を決定する。

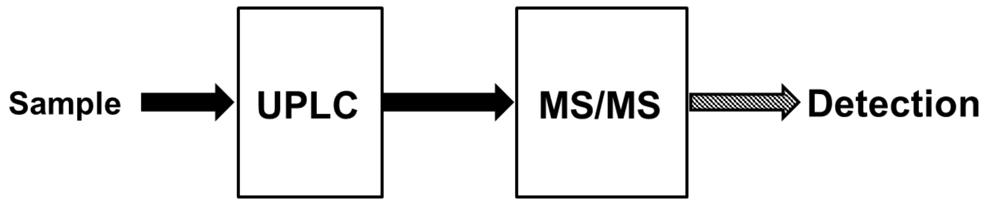


Fig.4 UPLC-MS/MS 概略

UPLC は HPLC の一種で、HPLC よりも分離能が高い装置である。サクシニル-CoA、メチルマロニル-CoA、プロピオニル-CoA、および内部標準物質 (internal standard; IS) として用いるアセチル-CoA を分離できる測定条件として、使用する移動相やカラムなどを検討した。

MS/MS は multiple reaction monitoring (MRM) モードで測定する。サクシニル-CoA、メチルマロニル-CoA、プロピオニル-CoA、およびアセチル-CoA の標準品を用い、プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンの質量電荷比 (*m/z*) をそれぞれ調べ、これにより MS/MS の測定条件を決定した。

1. 3. 検量線

1. 3. (1) サクシニル-CoA 定量用の標準品希釈列

サクシニル-CoA 標準品水溶液の濃度を 1 mM とし、–80 °C で保存した。この 1 mM サクシニル-CoA から、0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.1, 6.2, 13, 25, 50, 100 µM 希釈列を作製した。1 mM アセチル-CoA 水溶液を–20 °C で保存し、内部標準物質 (IS) として使用するため 10 µM とした。500 mM トリス硫酸塩緩衝液 (tris (hydroxymethyl) aminomethane sulfate buffer; Tris-sulfate buffer) (pH 7.5) / 2.5 mM アデノシルコバラミン/ 300 mM $HClO_4$ (1:1:5, v/v/v) 混合溶液を 80 µL ずつ 10 本のサンプルビンに入れ、サクシニル-CoA 希釈列と IS (10 µM) を 10 µL ずつそれぞれ加えた。以上のように、0.02, 0.04, 0.08, 0.15, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0, 10 µM のサクシニル-CoA 標準品溶液の希釈列を作製した(Fig. 5)。

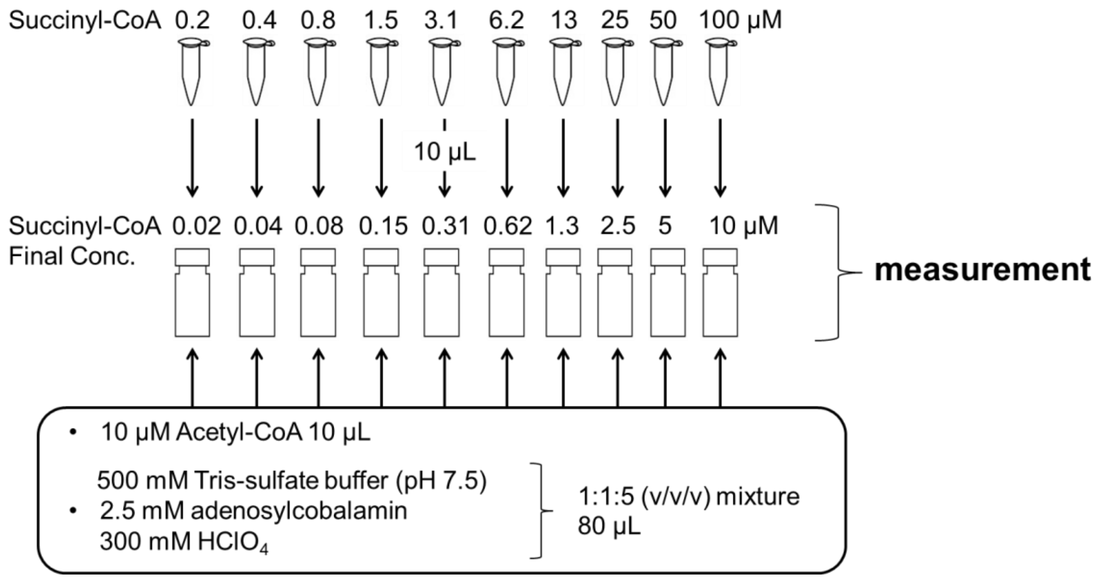


Fig. 5 サクシニル-CoA 検量線用希釈列の作製方法

1. 3. (2) メチルマロニル-CoA 定量用の標準品希釈列

–20 °C で保存したメチルマロニル-CoA (1 mM) から 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.1, 6.2, 13, 25, 50, 100 µM 希釈列を作製した。IS はサクシニル-CoA 定量の時と同様に、10 µM アセチル-CoA を用意した。300 mM $NaHCO_3$ / 30 mM ATP / 50 mM $MgCl_2$ / 80 mM K_2HPO_4 / 300 mM $HClO_4$ (1:1:1:2:9, v/v/v/v/v) 混合溶液を 80 µL ずつ 10 本のサンプルビンに入れ、メチルマロニル-CoA 希釈列と IS (10 µM) を 10 µL ずつそれぞれ加えた。以上のように、0.02, 0.04, 0.08, 0.15, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0, 10 µM のメチルマロニル-CoA 標準品溶液の希釈列を作製した(Fig. 6)。

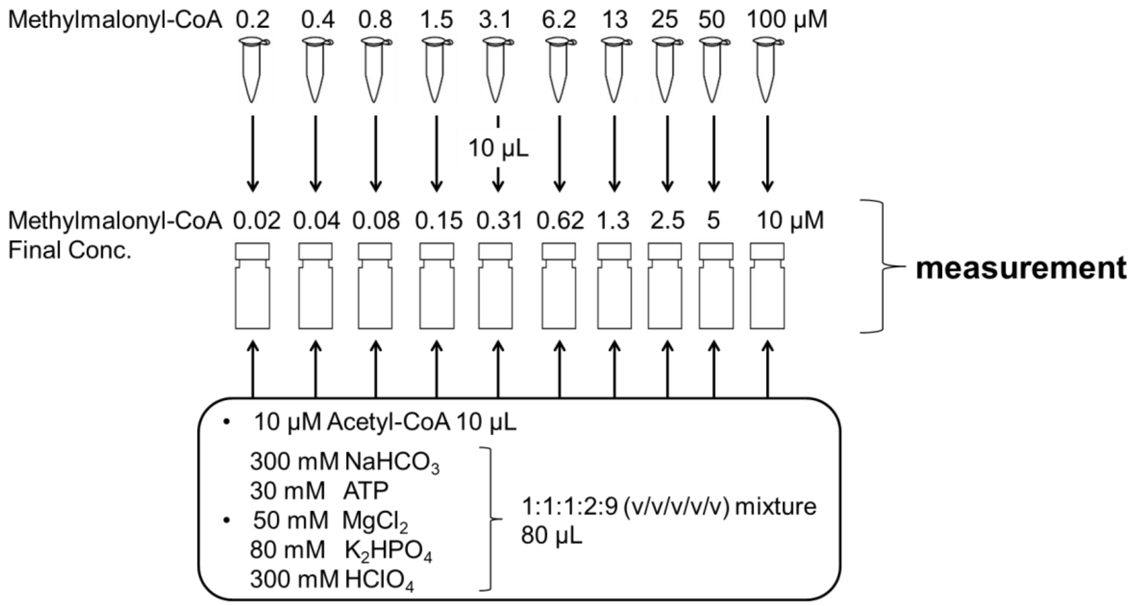


Fig. 6 メチルマロニル-CoA 検量線用希釈列の作製方法

1. 4. 再現性の評価

サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS における測定について、再現性を検討した。それぞれ 0.05, 0.5, 5 µM の濃度で日内変動、日間変動を調べた。

サクシニル-CoA は 500 mM Tris-sulfate buffer (pH 7.5) / 2.5 mM アデノシルコバラミン/ 300 mM $HClO_4$ (1:1:5, v/v/v) 混合溶液を使用して 0.05, 0.5, 5 µM の 3 種を作製した。

メチルマロニル-CoA は 300 mM $NaHCO_3$ / 30 mM ATP / 50 mM $MgCl_2$ / 80 mM K_2HPO_4 / 300 mM $HClO_4$ (1:1:1:2:9, v/v/v/v/v) 混合溶液を使用し 3 種の濃度を作

製した。
1 日の測定でそれぞれを 6 回ずつ測定することで日内変動を調べ、それを 3 日間行うことで日間変動を調べた。

2. 酵素反応法の検討

2. 1. リンパ球分離

本研究では、末梢血リンパ球から得た酵素を反応に利用した。以下の①-⑥の手順で血液から分離した。

① 血液を BD Vacutainer CPT (Cell Preparation Tube with Sodium Citrate; Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, NJ, USA) に採取し、遠心分離した (1500 x *g*, 21 °C, 20 分間) 。
② 上清を 15 mL 遠沈管に移しリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) を加え、遠心分離 (1700 rpm, 21 °C , 10 分間) した。
③ リンパ球 (沈殿物) を PBS で洗浄し、懸濁させた (全量 3 mL) 。
④ 懸濁液 30 μL とチュルク液 (Turk Solution; Wako; Japan) 30 μL を混ぜ、血球計算盤 (Erma; Japan) に乗せ顕微鏡でリンパ球数をカウントした。
⑤ カウント数を基に、リンパ球数が 5×10^5 個または 1×10^6 個になる懸濁液量を計算し、1.5 mL エッペンドルフチューブに分注した。
⑥ 遠心分離し (5000 rpm, 4 °C, 4 分間) 上清を取り除いてから－80 °C で保存した。

2. 2. 酵素反応法

MCM 活性測定の反応基質および反応物、PCC 活性測定の反応基質および反応物は Fig. 7 に示したとおりである。

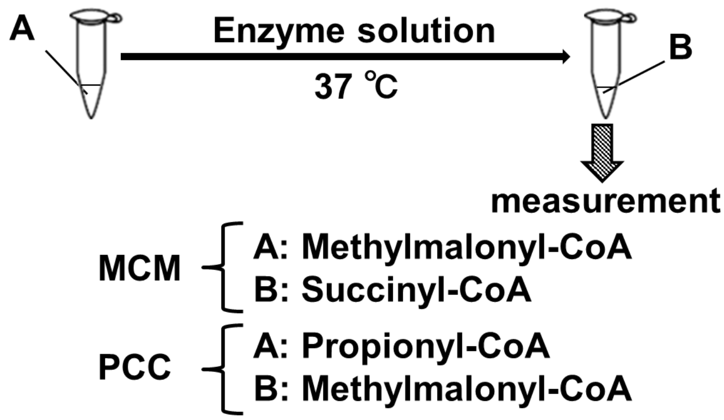


Fig. 7 MCM および PCC 反応の基質(A)と生成物(B)

2. 2. (1) MCM 活性測定法

リンパ球を 60 µL の 500 mM Tris-sulfate buffer (pH 7.5) で懸濁し、VP-050 ultrasonic homogenizer (TAITEC; Saitama, Japan) を利用して氷上で 10 秒間超音波破砕した。この懸濁液に MCM の補酵素であるアデノシルコバラミン (2.5 mM) を 20 µL 加え、37 ℃で数分温めた。メチルマロニル-CoA を MCM の基質として加え、37 ℃でインキュベートした。反応停止には 300 mM $HClO_4$ 100 µL を用い、20 µM IS 10 µL を加えた。その後、9000 x *g* で 10 分間遠心分離を行い、上清を UPLC-MS/MS で測定した。

本研究では、インキュベートする時間を 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 分とし、最適な反応時間を検討した。

2.2. (2) PCC 活性測定法

リンパ球を末梢血より分離し、800 mM K_2HPO_4 (pH 7.1) 60 µL で懸濁させ、氷上で 10 秒間超音波破砕を行った。ここに 300 mM $NaHCO_3$ 10 µL、30 mM ATP 10 µL、50 mM $MgCl_2$ 10 µL を加え、37 °C に温めた。プロピオニル-CoA を PCC の基質として加え、37℃でインキュベートした。300 mM $HClO_4$ 90 µL で反応を停止した後、20 µM IS 10 µL を加えた。その後、9000 x *g* で 10 分間遠心分離を行い、上清を UPLC-MS/MS で測定した。

本研究では、プロピオニル-CoA 濃度を 20, 30, 100, 250, 500, 800 µM とし、反応に適した基質濃度を調べた。また、反応時間を 1, 15, 30, 45, 60 分とし、最適な反応時間を検討した。

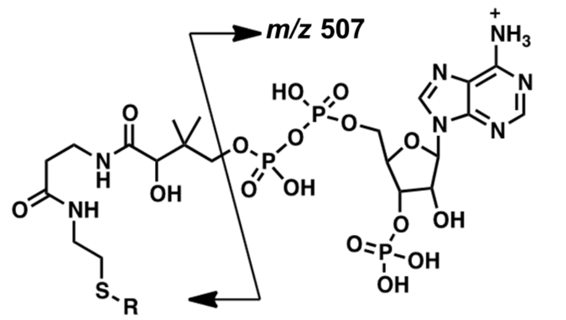
【結果】

1. サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS による定量法の確立

1. 1. UPLC-MS/MS 測定条件

MCM の酵素反応後の反応液中には、サクシニル-CoA (生成物) とメチルマロニル-CoA (未反応の基質) が、PCC の酵素反応後の反応液中には、メチルマロニル-CoA (生成物) とプロピオニル-CoA (未反応の基質) が、それぞれ存在する。また、アセチル-CoA を IS として用いるため、これら 4 種のアシル-CoA を UPLC-MS/MS で分離定量する条件を検討した。

タンデム質量分析計はエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 装置を備えた Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Waters) を使用した。窒素を nebulizing gas として、アルゴンを collision gas として用いた。Source temperature は 120 °C で、capillary voltage は 3.2 kV で使用した。ESI positive において、各アシル-CoA のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの *m/z*, cone voltage および collision energy は Fig. 8 および Table 1 に示した。サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA は構造異性体であり、プリカーサーイオンの *m/z* とプロダクトイオンの *m/z* はそれぞれ同じ値となった。



***m/z* 361 (Succinyl-CoA or Methylmalonyl-CoA)**
***m/z* 317 (Propionyl-CoA)**
***m/z* 303 (Acetyl-CoA)**

Succinyl-CoA : R = $COCH_2CH_2COOH$
Methylmalonyl-CoA : R = $COCH(CH_3)COOH$
Propionyl-CoA : R = $COCH_2CH_3$
Acetyl-CoA : R = $COCH_3$

Fig. 8 アシル-CoA の構造とコリジョンガスによる開裂

Table 1　MS/MS 測定条件

	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Succinyl-CoA	868	361	45	30
Methylmalonyl-CoA	868	361	45	30
Propionyl-CoA	824	317	45	30
Acetyl-CoA	810	303	45	30

UPLC は、gradient pump、vacuum degasser、autosampler から成る Acquity UPLC system (Waters) を使用した。カラムは Acquity UPLC BEH C18 1.7μm column (2.1 x 150 mm, Waters) を 45 °C で使用した。メチルマロニル-CoA、サクシニル-CoA、プロピオニル-CoA、およびアセチル-CoA の混合液 5 μL をカラムに注入し、移動相の流速を 0.4 mL/min とした。

サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA はプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンがそれぞれ同じ *m/z* 値であるため MS/MS による分離ができず、UPLC での分離が必須である。移動相を水系と有機溶媒系を用いるグラジエント分析として検討した。水とアセトニトリルを用いた場合では、サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA の分離が達成できなかったため、水系の移動層を 100 mmo/L ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 4.2) とした。その結果、サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA が分離したクロマトグラムが得られたが、各ピークのテーリングが大きかった (Fig. 9A) 。そこで、ギ酸アンモニウム濃度を 400 mM としたところ、Fig. 9B に示すようにピークのテーリングが小さくなった。よって、ギ酸アンモニウムの濃度を 400 mM とした。

Fig. 9B に示したようにギ酸アンモニウムの pH が 4.2 の場合は、サクシニル-CoA がメチルマロニル-CoA よりも後に流出した。MMA 患者では、MCM 反応の生成物であるサクシニル-CoA 生成量が僅かであることが考えられ、この条件での分析では、サクシニル-CoA のピークが基質であるメチルマロニル-CoA のピークのテーリング部分に隠れる恐れがある。そこでギ酸アンモニウムの pH を検討した結果、pH 7.5 にて、サクシニル-CoA がメチルマロニル-CoA よりも先に流出した (Fig. 9C) 。よって、移動相を 400 mM ギ酸アンモニウム (pH 7.5) 水溶液 (A 相) と、アセトニトリル (B 相) との Gradient 分析とした。

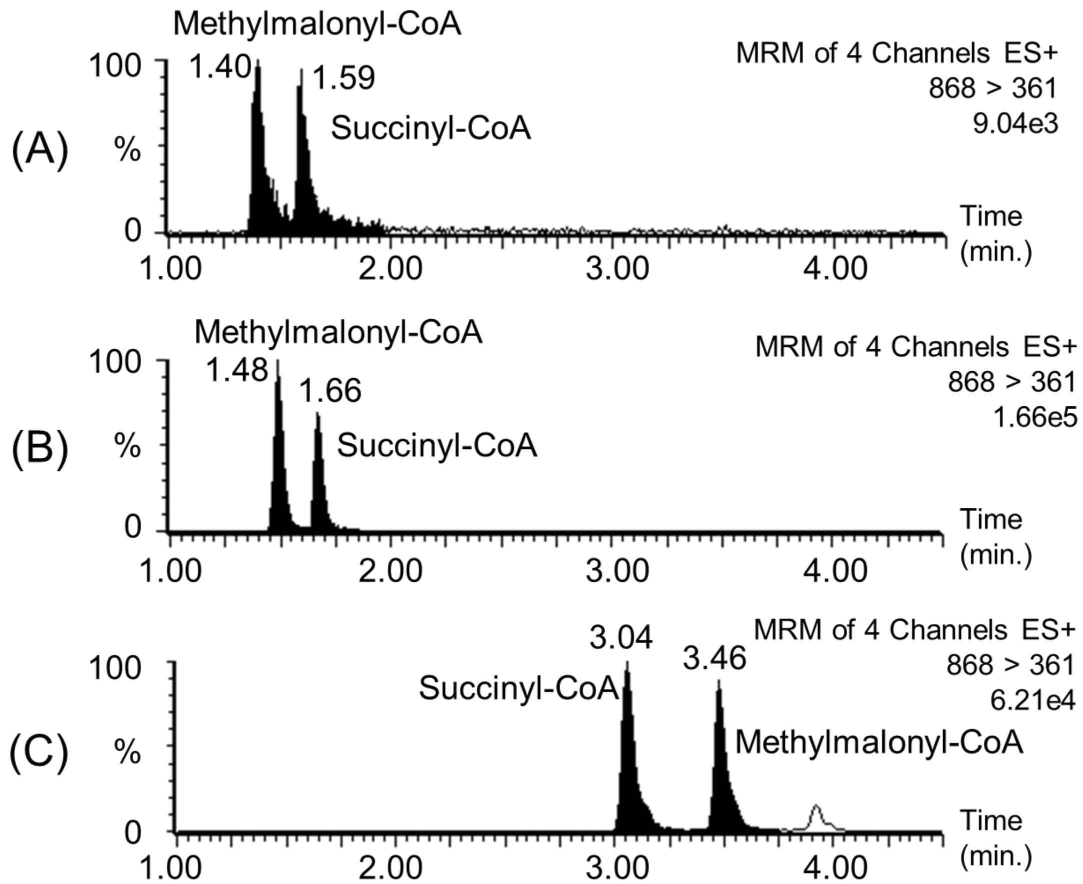


Fig. 9 サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA のクロマトグラム

(A) 移動相：100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.2, アセトニトリル
(B) 移動相：400 mM ギ酸アンモニウム pH 4.2, アセトニトリル
(C) 移動相：400 mM ギ酸アンモニウム pH 7.5, アセトニトリル

4 種のアシル-CoA を、アセトニトリル (B 相) を 2%で開始し、5 分で 5%、5-7 分で 40%、7-7.1 分で 60%、7.1-8 分で 60%を保つ Gradient 分析 (Fig. 10) を行うことで、Fig. 11 に示したクロマトグラムを得た。

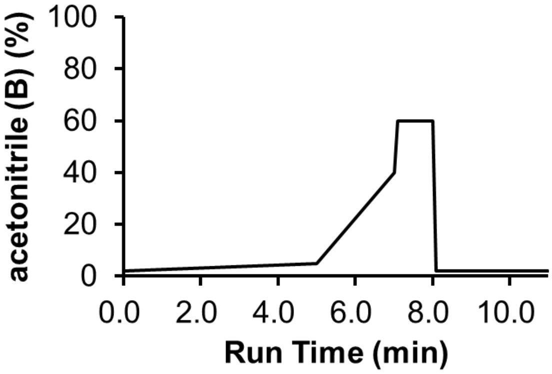


Fig. 10 UPLC の Gradient

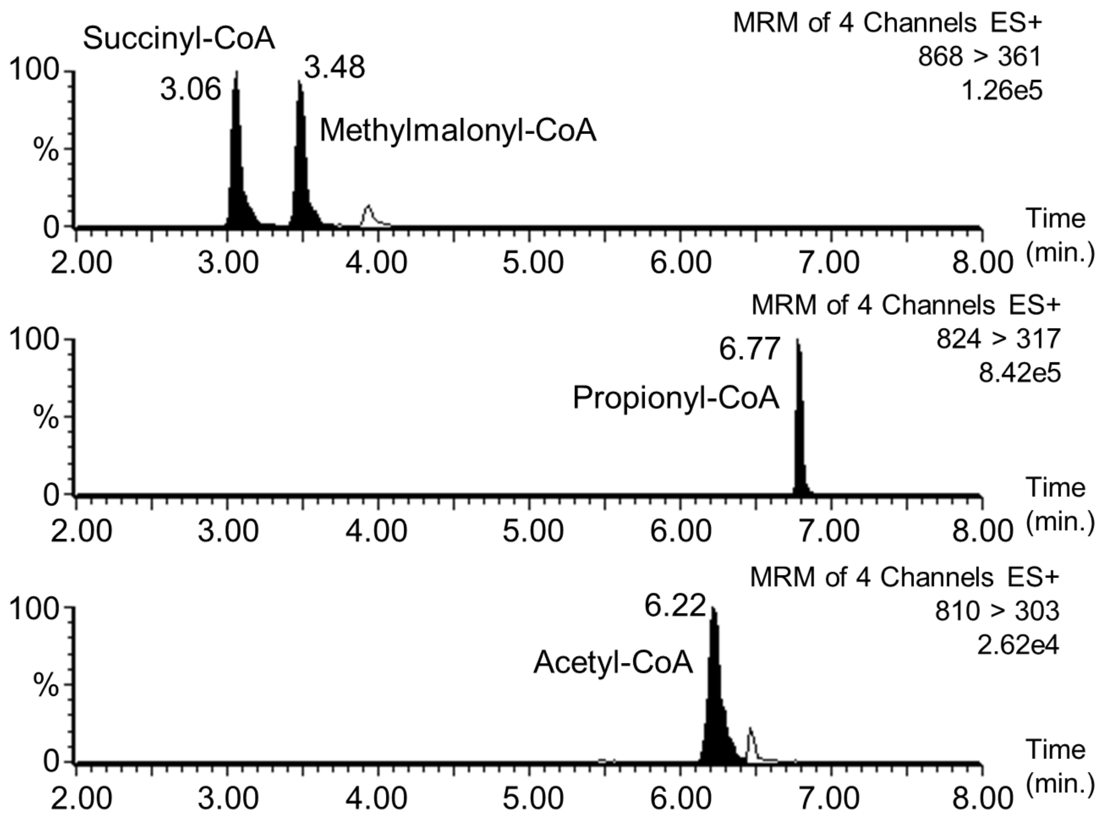


Fig. 11 サクシニル-CoA、メチルマロニル-CoA、プロピオニル-CoA、アセチル-CoA 標準品の MRM クロマトグラム

1. 2. 検量線

検量線用希釈列を UPLC-MS/MS にて測定し、x 軸を「分析物質 (サクシニル-CoA またはメチルマロニル-CoA) 濃度 (µM) 」、y 軸を「分析物質のピーク面積値 / IS のピーク面積値」として、サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA の検量線をそれぞれ作成した。サクシニル-CoA の検量線の式は y = (0.349 ± 0.0161) x + (0.00 ± 0.0013) (R^2 = 0.9978 ± 0.0018) (n = 10) 、メチルマロニル-CoA の検量線の式は y = (0.292 ± 0.0208) x + (0.00 ± 0.0013) (R^2 = 0.9979 ± 0.0012) (n = 10) で、共に 0.02-10 µM の範囲で直線性が得られた (Fig. 12) 。

サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA の定量限界値と検出限界値は共にそれぞれ 0.02 µM と 0.007 µM だった。

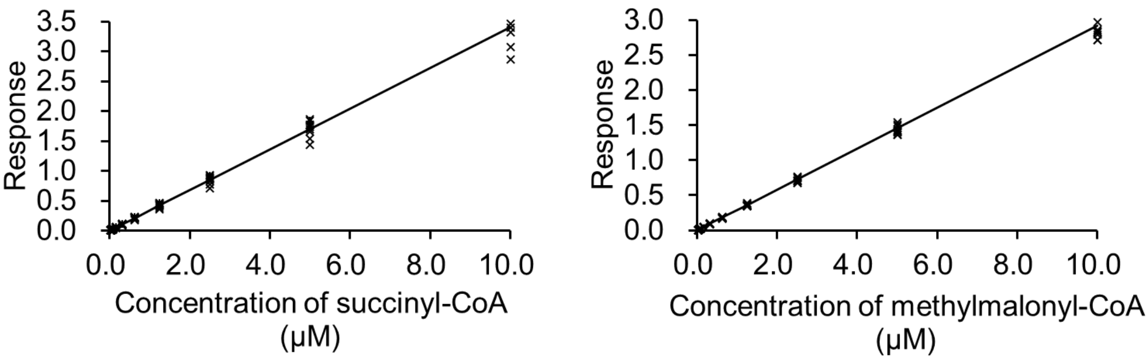


Fig. 12 検量線 (n = 10) (左; サクシニル-CoA、右; メチルマロニル-CoA)

1. 3. 再現性の評価

サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA それぞれについて、MS/MS における精度と真度を調べた。精度は変動係数 (coefficient of variation; CV) で評価した。それぞれの数値は Table 2 に示した通りで、サクシニル-CoA は精度が日内で 5.2%以下、日間で 8.7%以下、真度が日内で 3.5%以下、日間で 1.2%以下だった。メチルマロニル-CoA は精度が日内で 8.7%以下、日間で 13.6%以下、確度が日内で 4.3%以下、日間で 3.1%以下だった。この結果より、良好な再現性が得られた。

Table 2 サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS による測定での再現性 (日内変動および日間変動)

Acyl-CoA	Concentration (μM)	Imprecision CV (%)		Accuracy (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Succinyl-CoA	0.05	5.2	8.7	0.2	0.2
	0.5	2.8	6.0	3.5	0.3
	5	1.6	6.8	−0.7	−1.2
Methylmalonyl-CoA	0.05	8.2	13.6	−4.3	3.1
	0.5	8.7	10.5	0.5	−0.8
	5	5.1	5.9	−0.7	1.7

＊Intra-day: n = 6　＊CV: coefficient of variation
＊Inter-day: n = 18

2. 酵素反応法の検討

2. 1. MCM 活性測定

MCM 活性測定には、5 x 10^5 個のリンパ球中の酵素に、補酵素としてアデノシルコバラミンを加え、基質として 22.2 μM メチルマロニル-CoA を利用した。

健常人のリンパ球を用い、MCM 反応を行い、反応後の反応液を UPLC-MS/MS で分析したところ、サクシニル-CoA の生成が確認できた (Fig. 13) 。

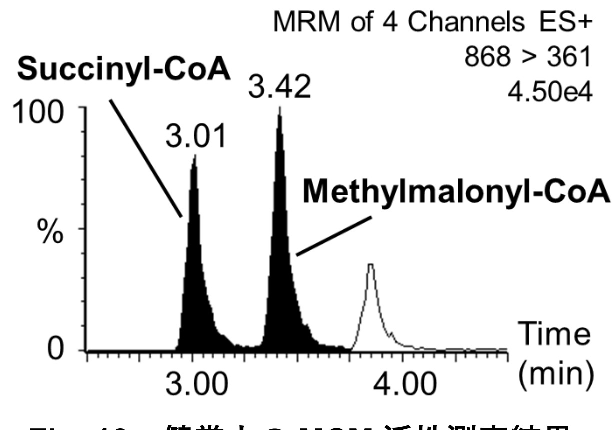


Fig. 13　健常人の MCM 活性測定結果

MCM 反応の反応時間について検討したところ、反応時間 15 分まではサクシニル-CoA の生成量が増加し 2.13 μM となったが、それ以降は減少した (Fig.

14) 。反応時間 15 分のとき、患者の酵素活性が低く健常人の 100 分の 1 程度である場合にはサクシニル-CoA が 0.021 μM 生成すると思われる。よって、サクシニル-CoA の定量限界値から、MCM 活性を約 1%まで測定し重症と軽症を判別するために、15 分を反応時間とした。

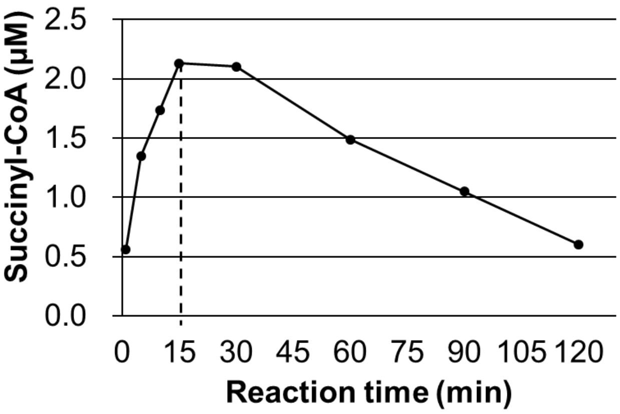


Fig. 14 反応時間によるサクシニル-CoA 生成量の変化

2. 2. PCC 活性測定

PCC 活性測定では、1 x 10^6 個のリンパ球を用い、反応に必要な $NaHCO_3$、ATP、$MgCl_2$ を加えた。

健常人のリンパ球を用い、PCC 反応を行い、反応液を UPLC-MS/MS で測定したところ、メチルマロニル-CoA の生成が確認できた (Fig. 15) 。

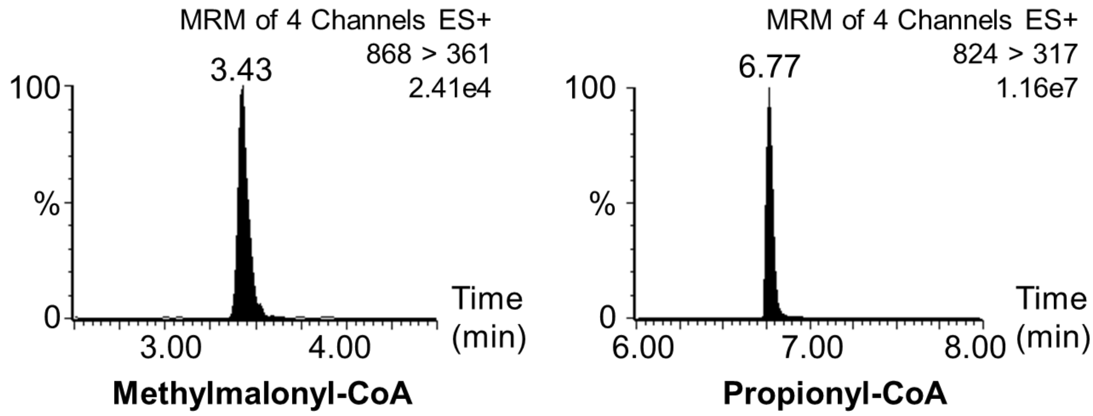


Fig. 15 健常人の PCC 活性測定結果

PCC 反応では、MCM 反応と同じ濃度のプロピオニル-CoA で反応を行ってもメチルマロニル-CoA が十分に生成しなかった。そこで、基質濃度を変えて PCC 反応を行い、基質濃度と活性値についてミカエリス-メンテンプロットを作成したところ、ミカエリス定数 (*Km*) が 59.4 µM、最大反応速度 (*Vmax*) が 370.4 pmol/30 min となった (Fig. 16) 。本研究では、十分量メチルマロニル-CoA が生成する 500 µM を基質濃度とした。

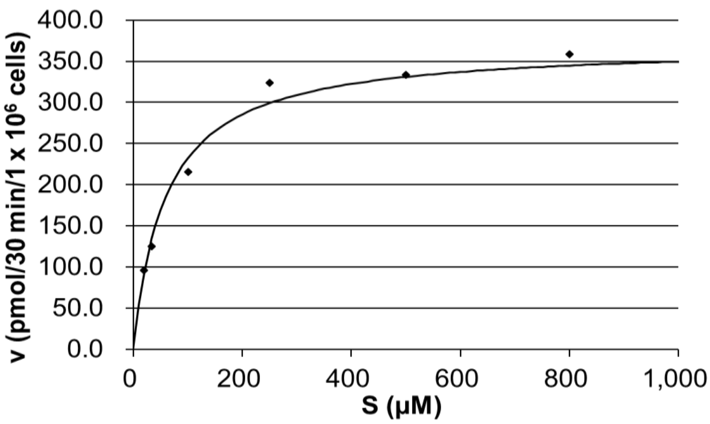


Fig. 16 ミカエリス-メンテンプロット
;基質濃度に対するメチルマロニル-CoA 生成速度
(S; 基質濃度、v; 生成速度)

PCC 活性測定の反応時間について調べたところ、反応時間 30 分まではメチルマロニル-CoA の生成量が増加したが、30 分以降は時間あたりの増加率が減少した (Fig. 17) 。よって、反応時間を 30 分とした。

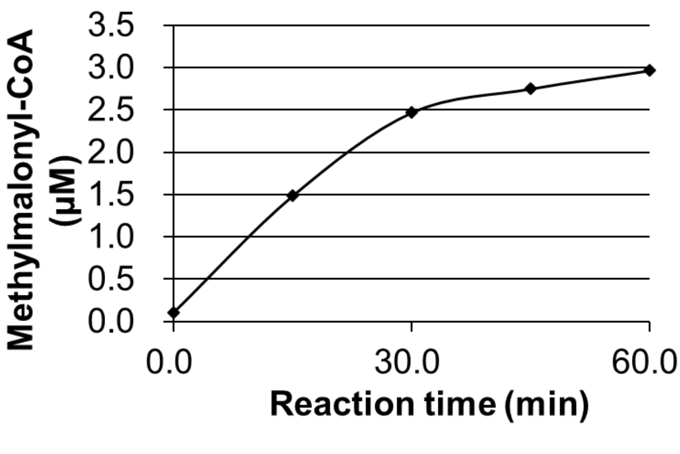


Fig. 17 反応時間によるメチルマロニル-CoA 生成量の変化

【考察】

1. サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS による定量法の確立

MMA 及び PA の原因酵素の活性値を知ることは、疾患の重症度の判別に利用出来るため、治療方針の決定や QOL 向上に有用であると考えられる。患者の酵素活性は、リンパ球中の酵素を利用して基質を反応させ、生成物を定量し、健常人の酵素利用時の生成量に対する割合を算出することで測定する。よって、酵素活性測定法の確立のためには生成物の定量が必要だが、酵素反応後の溶液中には、反応生成物と未反応の基質が混在している。そこで、反応生成物を分離し定量するために UPLC-MS/MS を利用し、MCM および PCC 反応の基質または生成物であるサクシニル-CoA、メチルマロニル-CoA、プロピオニル-CoA、およびアセチル-CoA (IS) の UPLC-MS/MS による定量法を確立した。

サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA は構造異性体であり、MS におけるプリカーサーイオンの *m/z* およびプロダクトイオンの *m/z* は同じ値となり、MS/MS による *m/z* の値では両物質を分離出来ない。そこで、UPLC にてサクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA を分離する条件を検討した。その結果、ODS カラムである Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm column と、400 mM ギ酸アンモニウムおよびアセトニトリルを移動相に用いる条件で、サクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA を分離した。ギ酸アンモニウムの濃度は一般的に 10 mM 程度で用いられるが、その場合、各アシル-CoA のピークのテーリングが大きかった。100 mM ギ酸アンモニウムを利用した場合には、やや改善したものの、依然テーリングが見られた (Fig. 9A) 。ギ酸アンモニウム濃度を大きくするにつれ、テーリングは小さくなり、ギ酸アンモニウムの濃度を 400 mM とすることで、テーリングが改善された。

また、400 mM ギ酸アンモニウム水溶液の pH を検討し、pH 7.5 において、サクシニル-CoA がメチルマロニル-CoA より先に流出した。ギ酸アンモニウム水溶液の pH が 7.5 以下ではメチルマロニル-CoA とサクシニル-CoA のピークが分離しない、またはメチルマロニル-CoA がサクシニル-CoA より先に流出した。メチルマロン酸 (methylmalonic acid) の p*K*a 値 は 3.05、コハク酸 (succinic acid) の p*K*a 値は 4.19 であり [27]、メチルマロニル-CoA とサクシニル-CoA の p*K*a 値にも違いがあると考えられ、移動相の pH を変えたことで両物質の解離型と非解離型の比に影響し、流出順序が変わったと考えられる。

MCM の反応は、基質がメチルマロニル-CoA、生成物がサクシニル-CoA であり、MCM 活性が低い場合はサクシニル-CoA の生成量が僅かとなる。サクシニ

ル-CoA がメチルマロニル-CoA よりも後に検出されると、クロマトグラムでのピークがメチルマロニル-CoA のピークのテーリング部分に隠れ、サクシニル-CoA の定量が正確に出来ないと推察された。以上より、サクシニル-CoA がメチルマロニル-CoA よりも先に検出される、pH 7.5 の 400 mM ギ酸アンモニウム水溶液が移動相として適していると考えた。

サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA について作成した検量線で、直線性が得られたこと (Fig. 12)、 および、測定精度と真度の日内・日間変動の結果で、良好な再現性が得られたこと (Table 2) より、サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA の UPLC-MS/MS による高精度な定量法を確立できたと考えられる。

2. 酵素反応法の検討

2. 1. MCM 活性測定

MCM の酵素反応には、補酵素であるアデノシルコバラミンが必須であり、反応時に酵素液に加えた。反応液中のメチルマロニル-CoA 濃度は、サクシニル-CoA が十分量生成したことを UPLC-MS/MS で確認し、22.2 μM とした。

新生児では、採血可能な血液量が成人よりも少なく、酵素反応に使用できるリンパ球数に限りがある。新生児から約 1 mL 採血したときに確実に得られる 5 x 10^5 個のリンパ球を使用することとした。

MCM 活性測定の反応時間の検討の結果、15 分以上の反応ではサクシニル-CoA 量が減少した。サクシニル-CoA を 37 °C でインキュベーションしたところ、時間と共にサクシニル-CoA が減少した。これは、サクシニル-CoA が分解し free-CoA やその二量体が生成したことによると考えられる。MCM 活性を約 1%まで測定するために、15 分を最適な反応時間とした。

以上のことから、肝細胞などよりも患者負担が少ない末梢血リンパ球を利用し、低活性まで測定できる UPLC-MS/MS を利用した MCM 活性測定法を確立できた。

2. 2. PCC 活性測定

PCC の基質濃度を MCM 活性測定の基質と同じ濃度にしたところ、MCM 反応で生成するサクシニル-CoA 量よりも、PCC 反応でのメチルマロニル-CoA の生成量が低かった。そこで、生成量を増加させるため、リンパ球数を 1 x 10^6 個

に増やした。さらに、基質 (プロピオニル-CoA) 濃度の検討を行った。Fig. 16 より、反応液中の基質濃度を 500 μM としたときに十分にメチルマロニル-CoA が生成しており、かつ、これ以上基質濃度を濃くしても生成するメチルマロニル-CoA 量は変わらなかった。よって、PCC 活性測定の基質濃度を 500 μM とした。

反応時間は、PCC 活性を約 1%測定できる反応時間として、30 分が最適であると考えた。

2014 年に Damavandi らは、Hela 細胞を反応に利用し、UPLC-MS/MS を定量に利用した PCC 活性測定法を報告した [28]。この方法では、基質であるプロピオニル-CoA の減少量から、活性値を算出したが、PCC 活性が低い場合に基質の減少量は不明瞭であり、その活性値を測定するのは難しい。よって、本研究において PCC 活性値はメチルマロニル-CoA 生成量から算出した。

以上のことから、肝細胞などよりも患者負担が少ない末梢血リンパ球を利用し、低活性まで測定できる UPLC-MS/MS を利用した PCC 活性測定法を確立できた。

【小括】

本研究にて確立した MCM および PCC 活性測定法は以下の通りである。

1. MCM 活性測定

リンパ球を 500 mM Tris-sulfate buffer (pH 7.5) 60 µL で懸濁し、VP-050 ultrasonic homogenizer (TAITEC; Saitama, Japan) を利用して氷上で 10 秒間超音波破砕した。この懸濁液に 2.5 mM アデノシルコバラミン 20 µL を加え、37 ℃で数分温めた。200 µM メチルマロニル-CoA 10 µL を MCM の基質として加え、37 ℃で 15 分間インキュベートした。反応停止には 300 mM $HClO_4$ 100 µL を用い、20 µM IS 10 µL を加えた。その後、9000 x *g* で 10 分間遠心分離を行い、上清を UPLC-MS/MS で測定した。

2. PCC 活性測定

リンパ球を 800 mM K_2HPO_4 (pH 7.1) 60 µL で懸濁させ、氷上で 10 秒間超音波破砕を行った。ここに 300 mM $NaHCO_3$ 10 µL、30 mM ATP 10 µL、50 mM $MgCl_2$ 10 µL を加え、37 °C に温めた。5 mM プロピオニル-CoA を PCC の反応液に 10 µL 加え、37℃で 30 分間インキュベートした。300 mM $HClO_4$ 90 µL で反応を停止した後、20 µM IS 10 µL を加えた。その後、9000 x *g* で 10 分間遠心分離を行い、上清を UPLC-MS/MS で測定した。

3. UPLC-MS/MS 測定条件

3. 1. MS/MS

Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Waters) を利用し、MRM モードで測定した。各アシル-CoA の *m/z* は以下の通りであった; サクシニル-CoA およびメチルマロニル-CoA: *m/z* 868→361, プロピオニル-CoA: *m/z* 824→317, アセチル-CoA: *m/z* 810→303。

3. 2. UPLC

Acquity UPLC system (Waters) を使用した。カラムは Acquity UPLC BEH C18 1.7µm column (2.1 x 150 mm, Waters) を 45 °C で使用した。移動相は 400 mM ギ酸アンモニウム (pH 7.5) (A 相) とアセトニトリル (B 相) を使用し、流速は 0.4 mL/min とした。アセトニトリル (B 相) を 2%で開始し、5 分で 5%、5-7 分で 40%、7-7.1 分で 60%、7.1-8 分で 60％を保つ Gradient 分析を行った。

Ⅱ. MMA 患者および PA 患者における代謝酵素活性測定

確立した代謝酵素活性測定法を利用して患者の酵素活性値を測定し、活性値から重症度の判別が可能であるか確認する。

【実験方法】

1. MMA 患者の MCM 活性測定

1. 1. 患者サンプル

酵素活性測定の対象 MMA 患者は、新生児マススクリーニングで発見された患者、MS/MS による新しい新生児マススクリーニング開始前に発症した患者の内、本邦の医療機関から活性測定の依頼を受けた患者とした。活性測定患者は 13 名で、4 名は無症状の軽症型 MMA 患者であり、9 名は低血糖や高アンモニア血症、アシドーシスなど様々な症状を示す重症患者だった。国立成育医療研究センターの倫理委員会に従い各医療機関で患者または患者の親権者からインフォームドコンセントを得たあとに採血し、単核球分離用採血管 BD Vacutainer CPT に入れて遠心後、常温で当研究室に送られた。また、患者との比較のため、同時に採血した健常人 (成人) の血液サンプルも送付された。

1. 2. MCM 活性測定

健常人 14 名と MMA 患者 13 名のリンパ球 (5×10^5 個) を用いて酵素反応を行った。反応条件は、「Ⅰ-2. 酵素反応法の検討」で確立した条件であり、リンパ球から得た酵素を利用し、22.2 μM メチルマロニル-CoA を基質として反応させ、サクシニル-CoA 生成量を UPLC-MS/MS で測定した。酵素反応によって生成したサクシニル-CoA 量から MMA 患者の MCM 活性値を算出した。

2. PA 患者の PCC 活性測定

2. 1. 患者サンプル

PA 患者は MMA 患者と同様に、新生児マススクリーニングで発見された患者、MS/MS による新しい新生児マススクリーニング開始前に発症した患者の内、本邦の医療機関から活性測定の依頼を受けた患者である。PCC 活性測定患者は 23 名で、21 名が無症状の軽症型 PA 患者であり、2 名が重症患者だった。重症患者では、低血糖や高アンモニア血症、アシドーシスなど様々な症状が確

認された。MCM と同様に、患者または患者の親権者からインフォームドコンセントを得た後で採血し、遠心分離後、当研究室に送られた。

2. 2. PCC 活性測定

健常人 29 名と PA 患者 23 名のリンパ球 (1 x 10^6 個) で酵素反応を行った。反応条件は、「I -2. 酵素反応法の検討」で確立した条件であり、リンパ球から得た酵素を利用し、500 μM プロピオニル-CoA を基質として反応させ、メチルマロニル-CoA 生成量を UPLC-MS/MS で測定した。酵素反応によって生成したメチルマロニル-CoA 量から PCC 活性値を算出した。

【結果】

1. MMA 患者の MCM 活性測定

健常人、重症 MMA 患者、無症状である軽症 MMA 患者から得たリンパ球を用い酵素反応をおこなったあとの、反応液の UPLC-MS/MS におけるクロマトグラム (それぞれ 1 例ずつ) を Fig. 18 に示した。また、健常人 15 名と MMA 患者 13 名(Patient A-M)の MCM 活性測定結果を Table 3 に示した。

健常人のリンパ球を利用した酵素反応では、生成物であるサクシニル-CoA のクロマトグラムピークが確認でき、サクシニル-CoA 生成量 (平均値 ± 標準偏差) は 465.5 ± 46.2 pmol/15 min/5 x 10^5 cells だった (Fig. 18A, Table 3) 。軽症患者 4 名 (Patient A-D) はサクシニル-CoA が 4.7-81.9 pmol/15 min/5 x 10^5 cells 生成し (Fig. 18B, Table 3) 、重症患者 9 名 (Patient E-M) は全て検出限界以下であった (Fig. 18C, Table 3) 。遺伝子変異が判明している患者についてはその変異を Table 3 に示した。

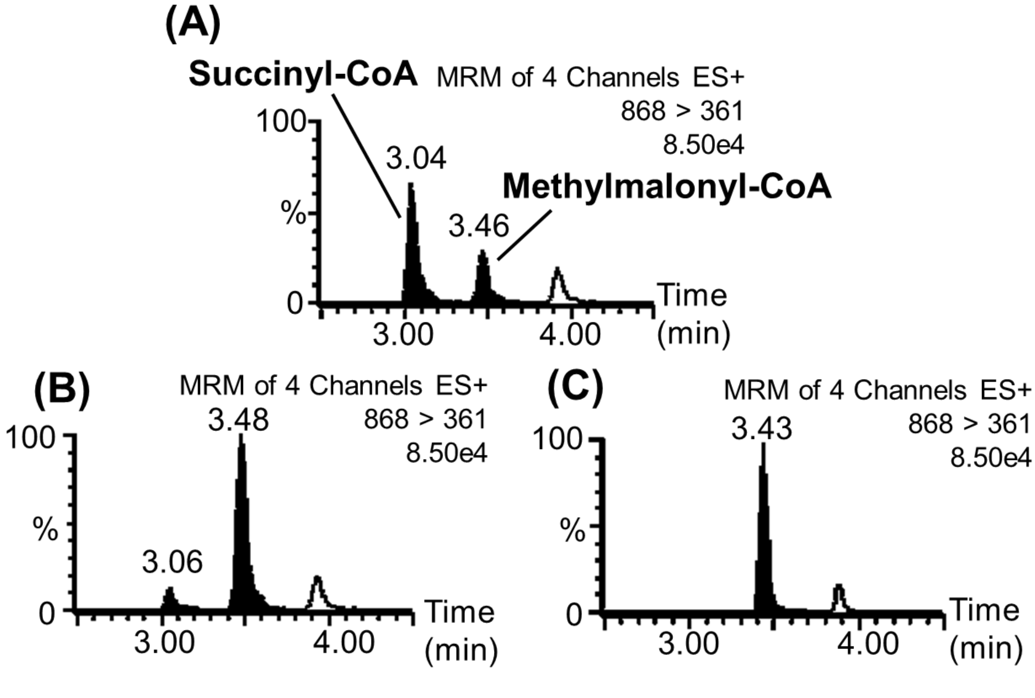


Fig. 18　MCM 反応後のクロマトグラム
(A; 健常人、B; 軽症 MMA 患者、C; 重症 MMA 患者)

Table 3　MMA 患者における MCM 活性値と遺伝子変異

		Produced amounts of Succinyl-CoA (pmol/15 min/5 x 10^5cells)	MCM activity (%)	Gene mutation
Healthy individuals (n = 15)		465.5 ± 46.2	100.0	
Mild MMA (n = 4)	A	32.1	6.9	E117X / —[1)]
	B	4.7	1.0	—[2)]
	C	58.7	12.6	—[2)]
	D	81.9	17.6	—[2)]
Severe MMA (n = 9)	E	—[3)]	—[4)]	G270E/P654PfsX18
	F	—[3)]	—[4)]	c.1560+1 G>T/L692P
	G	—[3)]	—[4)]	R228Q/R369H
	H	—[3)]	—[4)]	R108H/c.729_730insTT
	I-M	—[3)]	—[4)]	—[2)]

1) unknown, 2) not examined, 3) below limit of detection, 4) below 0.3%

2. PA 患者の PCC 活性測定

健常人、重症 PA 患者、無症状である軽症 PA 患者から得たリンパ球を用い酵素反応をおこない、反応液の UPLC-MS/MS による分析でのクロマトグラム (それぞれ 1 例ずつ) を Fig. 19 に示した。また、健常人 29 名と PA 患者 23 名 (Patient A-W) の PCC 活性測定結果を Table 4 に示した。

健常人のリンパ球を用いた酵素反応では、生成物であるメチルマロニル-CoA のクロマトグラムピークが確認でき、メチルマロニル-CoA 生成量 (平均値 ± 標準偏差) は 312.2 ± 68.7 pmol/30 min/5 x 10^5 cells だった (Fig. 19A, Table 4) 。軽症患者 21 名 (Patient A-U) はメチルマロニル-CoA が 3.1-71.8 pmol/30 min/1 x 10^6 cells 生成し (Fig. 19B, Table 4) 、重症患者 2 名 (Patient V, W) は全て検出限界以下であった (Fig. 19C, Table 4) 。遺伝子変異が判明している患者についてはその変異を Table 4 に示した。

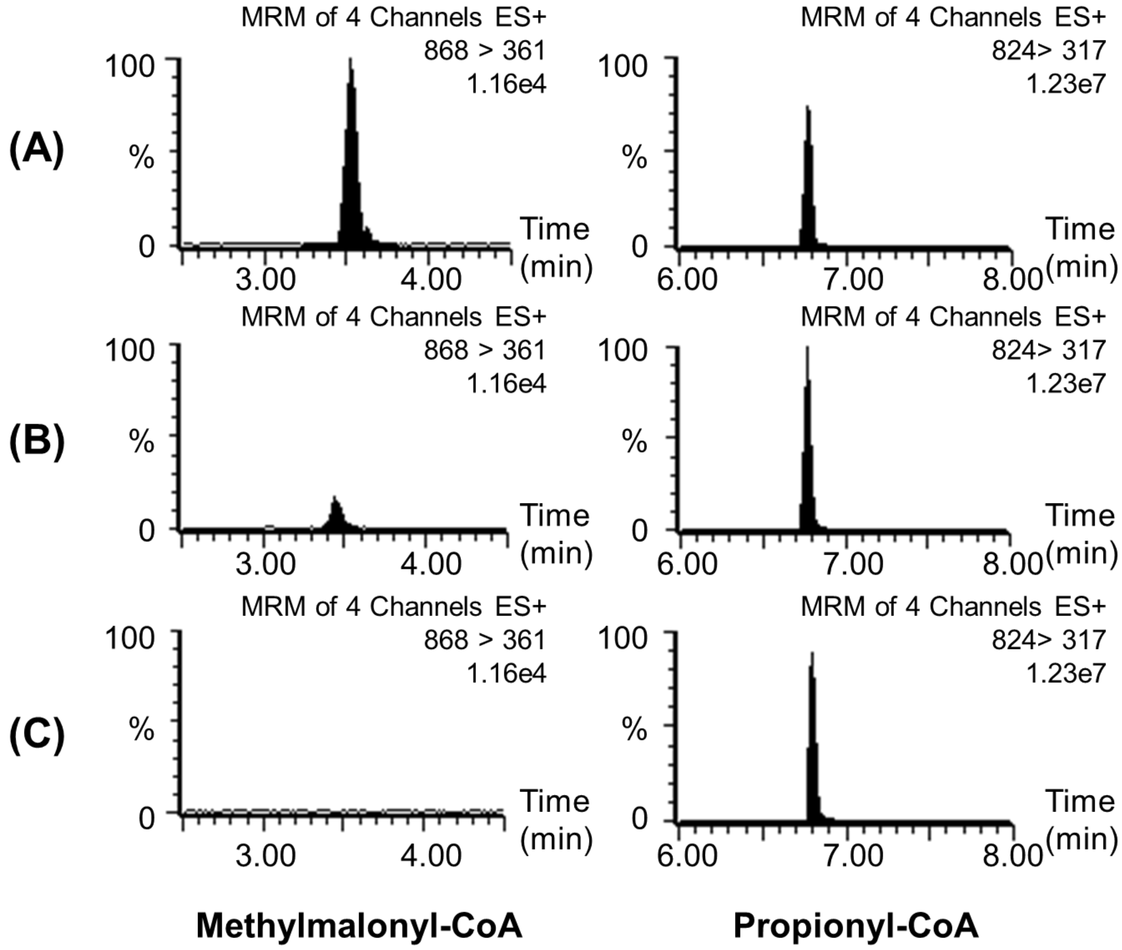


Fig. 19　PCC 反応後のクロマトグラム
(A; 健常人、B; 軽症 PA 患者、C; 重症 PA 患者)

Table 4 PA 患者における PCC 活性値と遺伝子変異

		Produced amounts of Methylmalonyl-CoA (pmol/30 min/1 x 10^6cells)	PCC activity (%)	Gene mutation
Healthy individuals (n = 29)		312.2 ± 68.7	100.0	
Mild PA (n = 21)	A	10.6	3.4	
	B	13.7	4.4	
	C	15.9	5.1	Y435C/Y435C
	D	24.7	7.9	
	E	26.5	8.5	
	F	3.1	1.0	Y435C/T428I
	G	3.4	1.1	Y435C/—[1]
	H	25.3	8.1	Y435C/I430L
	I	28.7	9.2	Y435C/T428I
	J	35.0	11.2	Y435C/c. 183+3G>C
	K	43.4	13.9	Y435C/I430L
	L	71.8	23.0	Y435C/c.1299+3_+10del
	M	8.1	2.6	R77W/c.923 dup T
	N	9.4	3.0	R77W/W559L
	O	28.1	9.0	G437C/—[1]
	P	3.4	1.1	—[2]
	Q	5.6	1.8	—[2]
	R	6.9	2.2	—[2]
	S	7.5	2.4	—[2]
	T	19.0	6.1	—[2]
	U	30.9	9.9	—[2]
Severe PA (n = 2)	V	—[3]	—[4]	R410W/R512C
	W	—[3]	—[4]	—[2]

1) unknown, 2) not examined, 3) below limit of detection, 4) below 0.4%

【考察】

1. MMA 患者の MCM 活性測定

MMA 患者の MCM 活性値は、健常人でのサクシニル-CoA 生成量に対する患者での生成量の割合とした (Table 3) 。UPLC-MS/MS でのサクシニル-CoA の検出限界値から算出した MCM 活性値の測定限界値は 0.3%である。MMA 患者 13 名のうち、臨床症状から軽症と診断された 4 名 (無症状, Patient A-D) は酵素反応後の反応液中にサクシニル-CoA の生成が確認でき、MCM 活性は 1%以上となった。一方、重症患者 9 名(Patient E-M)では酵素反応後の反応液の分析で、サクシニル-CoA のピークが検出されなかったため、MCM 活性は 0.3%未満とした。軽症患者 4 名と重症患者 9 名で活性値に違いが見られたことから、本研究で開発した MCM 活性測定法により重症度を判別できる可能性があると考えられる。

遺伝子変異は医療機関においてインフォームドコンセントを得た患者で調べられた。軽症患者は遺伝子変異が 1 例しか調べられていないため、変異と酵素活性の関連は不明である。重症患者の遺伝子変異の内、数例は症状を発症した変異として過去に報告された変異であった [29-32]。 患者間においては特定の変異は見られず、変異と活性の関連の評価のためには引き続き患者データを集める必要があると考えた。

2. PA 患者の PCC 活性測定

MCM と同様に、健常人でのメチルマロニル-CoA 生成量に対する PA 患者での生成量の割合から PCC 活性値を算出した (Table 4) 。UPLC-MS/MS でのメチルマロニル-CoA の検出限界値から算出した PCC 活性の検出限界値は 0.4%である。臨床症状から軽症 (無症状) であった PA 患者 21 名 (Patient A-U) は、PCC 活性が 1%以上であった。2 名の重症 PA 患者(Patient V, W)は共に UPLC-MS/MS でのメチルマロニル-CoA のピークが検出されず、PCC 活性は 0.4%未満とした (Table 4) 。軽症患者と重症患者の間で酵素活性に違いが見られたことから、本研究にて確立した PCC 活性測定法を重症度判別に利用できる可能性があると考えられる。

PCC は、*PCCA* 遺伝子でコードされる 6 つの α サブユニットと、*PCCB* 遺伝子でコードされる 6 つの β サブユニットから成る ($\alpha_6\beta_6$) [11]。α サブユニットは、PCC に結合したビオチンをカルボキシル化し、β サブユニットがカルボキシビオチンとプロピオニル-CoA との反応を触媒することでメチルマロニル-

CoA を生成させる[33]。*PCCA* と *PCCB* どちらか一方に変異が起こることで PCC 活性が低下するといわれている[34, 35]。本研究で確認された遺伝子変異では、R77W、c. 923 dup T、W559L は *PCCA* 変異で、それ以外は *PCCB* 変異である。

無症状の軽症患者では、Y435C (c. T1304C) となる特定の変異が見られた。Y435C は *PCCB* 遺伝子の 13 番目のエクソン上の変異である[36]。Y435C のホモ接合体を有する PA 患者 (Patients A-E) の PCC 活性は 5%前後で、過去に報告された同じ変異を持つ 3 名の PA 患者の PCC 活性値 (6.9-7.5%)[36] とほぼ一致していた。 Y435C ヘテロ接合体を有する患者 (Patients F-L) の PCC 活性は 1-23%であった。これは Y435C 変異と組合わされた他の病原性変異の PCC 活性に差があるためと考えられるが、その詳細は未だ不明である。重症患者の遺伝子変異は 1 名のみ調べられていたが、遺伝子変異と活性値の関連は不明であり、今後も患者検体を測定する必要があると考えた。

本研究では重症度判別に必要な新たな MCM および PCC 活性測定法を開発した。この方法は末梢血中のリンパ球から酵素を得るため、肝細胞や皮膚線維芽細胞から酵素を得るよりも患者負担が少なく、血液サンプルが当研究室に届いてから 1-2 日で結果を出すことができる実用的な方法であるといえる。

MMA および PA は、重症型でも発症前のタンパク制限やカルニチン投与といった治療により症状を抑えられる疾患である。軽症型の場合は、タンパク制限はほぼ必要でない。これらのことから、疾患を早期に発見し、即座に治療方針を決定することは患者の命を救うだけでなく、QOL 向上につながる。酵素活性測定は、スクリーニングにより発見された患者の重症度を判別し、治療方針の決定に役立てられると考えられる。

将来の症状の発現の有無、酵素活性値と重症度および遺伝子変異の関連など、詳細が不明である点も多いので、経過観察およびさらなるデータの蓄積が必要である。

【総括】

本研究では、リンパ球中の MCM または PCC を利用した酵素反応を行い、それぞれの生成物であるサクシニル-CoA またはメチルマロニル-CoA を UPLC-MS/MS で定量する MCM および PCC の代謝酵素活性測定法を確立した。

UPLC の移動相として利用するギ酸アンモニウム水溶液の pH を 7.5 とすることで、サクシニル-CoA がメチルマロニル-CoA よりも先に流出した。これにより、MCM 活性が低い場合に僅かに生成するサクシニル-CoA のピークが、基質であるメチルマロニル-CoA のピークのテーリングに埋まらず、サクシニル-CoA を 0.02 μM まで定量することができた。0.05, 0.5, 5 μM のサクシニル-CoA 及びメチルマロニル-CoA を定量したときの各定量値の再現性を検討した。各濃度における精度と真度の日内変動 (n = 6) と日間変動 (n = 18) を調べた。その結果、両物質の定量において良好な再現性を得た。以上のことから、UPLC-MS/MS によるサクシニル-CoA とメチルマロニル-CoA の定量法を確立した。

また、リンパ球を利用した酵素反応の反応時間、反応基質濃度を検討し最適な反応条件を決定した。この反応条件で酵素反応を行い、生成量を UPLC-MS/MS で定量することで、MCM 活性を 0.3%まで、PCC 活性を 0.4%まで検出できた。本研究で確立した代謝酵素活性測定法では、リンパ球を使用するため、従来行われた皮膚線維芽細胞や肝細胞を使用する方法よりも患者負担が小さい。更に、リンパ球の利用では細胞培養の必要がないため、血液サンプルが当研究室に届いてから 1～2 日で酵素活性値を出すことができ、従来の細胞を利用する方法よりも迅速に臨床現場で活かすことができる。

本研究で確立した代謝酵素活性測定法を利用して MMA 患者 13 名および PA 患者 23 名の酵素活性を測定したところ、軽症患者 (MMA 患者 4 名, PA 患者 21 名) の MCM 活性または PCC 活性は 1%以上であった。一方、重症患者 (MMA 患者 9 名, PA 患者 2 名) はいずれの患者も生成物が検出されず、活性値は検出限界以下となった。本研究で確立した MCM および PCC 活性測定法は重症度の判別が可能であり、MCM や PCC の活性が確認できれば軽症である可能性が高いと判断した。しかし、現在症状が出ていない軽症患者が将来何らかの症状を発症するのか詳細は不明であるため、将来にわたり観察を続けることで今後の治療に役立てられる。

本研究では、MMA 患者では MCM をコードする遺伝子の変異が様々であり、特定の遺伝子変異は見られなかったが、PA の軽症患者では Y435C となる特定の変異が見られ、そのホモ接合体を有する患者の PCC 活性は 5%前後だった。活性値や重症度と様々な遺伝子変異との相関を見るには引き続き新たな患者データを集める必要がある。

本研究では UPLC-MS/MS を利用するための実用的で新たな MCM および PCC 活性測定法を確立した。測定した活性値は治療方針決定や患者の QOL の向上に役立てることが可能である。

【引用文献】

1) 日本先天代謝異常学会　新生児マススクリーニング対象疾患等診療ガイドライン 2015　(診断と治療社) 2015
2) Fujisawa D. Nakamura K. Mitsubuchi H. Ohura T. Shigematsu Y. Yorifuji T. Kasahara M. Horikawa R. Endo F. Clinical features and management oforganic acidemias in Japan, *J. Hum. Genet.* **58**, 769–774 (2013)
3) Fowler B. Leonard JV. Baumqartner MR. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias, *J. Inherit. Metab. Dis.* **31**, 350–360 (2008)
4) Manoli I. Venditti CP. Methylmalonic acidemia. In: Pagon RA. Adam MP. Ardinger HH. Bird TD. Dolan CR. Fong CT. Smith RJH. Stephens K (eds) Gene reviews. University of Washington, Seattle, pp 1993–2015, (2005)
5) Shuaib T. Al-Hashmi N. Ghaziuddin M. Megdad E. Abebe D. Al-Saif A. Doubi A. Aldhalaan H. Abouzied ME. Al-Owain M. Propionic acidemiaassociated with visual hallucinations, *J. Child. Neurol.* **27**, 799–803 (2012)
6) Laemmle A. Balmer C. Doell C. Sass J. O. Häberle J. Baumgartner MR. Propionic acidemia in a previously healthy adolescent with acute onset of dilated cardiomyopathy, *Eur. J. Pediatr.* **173**, 971–974 (2014)
7) Baumgartner MR. Hörster F. Dionisi-Vici C. Haliloglu G. Karall D. Chapman KA. Huemer M. Hochuli M. Assoun M. Ballhausen D. Burlina A. Fowler B. Grünert SC. Grünewald S. Honzik T. Merinero B. Pérez-Cerdá C. Scholl-Bürgi S. Skovby F. Wijburg F. MacDonald A. Martinelli D. Sass JO. Valayannopoulos V. Chakrapani A. Proposed guidelines for the diagnosis andmanagement of methylmalonic and propionic academia, *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 130 (2014)
8) Arbeiter AK. Kranz B. Wingen AM. Bonzel KE. Dohna-Schwake C. Hanssler L. Neudorf U. Hoyer PF. Büscher R. Continuous venovenous haemodialysis (CVVHD) and continuous peritoneal dialysis (CPD) in the acutemanagement of 21 children with inborn errors of metabolism, *Nephrol. Dial.Transplant.* **25**, 1257–1265 (2010)
9) Chapman KA. Gropman A. MacLeod E. Stagni K. Summar ML. Ueda K. Ah Mew N. Franks J. Island E. Matern D. Pena L. Smith B. Sutton VR. Urv T. Venditti C. Chakrapani A. Acute management of propionic academia, *Mol.Genet. Metab.* **105,** 16–25 (2012)
10) Picca S. Bartuli A. Dionisi-Vici C. Medical management and dialysis therapyfor the infant with an inborn error of metabolism, *Semin. Nephrol.* **28**, 477–480 (2008)
11) Cornejo V. Colombo M. Duran G. Mabe P. Jimenez M. De la Parra A. Raimann E.

Diagnosis and follow up of 23 children with organic acidurias, *Rev. Med. Chil.* **130**, 259–266 (2002)
12) Fenton WA. Gravel RA. Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Charles S, Arthur B, William S, David V, Barton C, Kenneth K, Bert V (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 2165–2193 (2001)
13) Dionisi-Vici C. Deodato F. Roschinger W. Rhead W. Wilcken B. Classical organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* **29**, 383–389 (2006)
14) Shigemateu Y. Hirano S. Hata I. Tanaka Y. Sudo M. Sakura N. Tajima T. Yamaguchi S. Newborn mass screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan, *J. Chromatoqr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **776**, 39–48 (2002)
15) Rashed MS. Ozand PT. Bucknall MP. Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry, *Pediatr. Res.* **38**, 324–331 (1995)
16) Millington DS. Kodo N. Norwood DL. Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism, *J. Inherit. Metab. Dis.* **13**, 321–324 (1990)
17) 山口清次　タンデムマス・スクリーニング　ガイドブック　(診断と治療社) 2013
18) Nakagawa K. Kawana S. Hasegawa Y. Yamaguchi S. Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS, *J. Chromatogr. B,* **878**, 942–948 (2010)
19) Morrow GIII, Mahoney MJ. Mathews C. Lebowitz J. Studies of methylmalonyl coenzyme A carbonylmutase activity in methylmalonic acidemia. I. Correlation of clinical, hepatic, and fibroblast data, *Pediatr. Res.* **9**, 641–644 (1975)
20) Suormala T. Wick H. Bonjour J.P. Baumgartner ER. Rapid differentialdiagnosis of carboxylase deficiencies and evaluation for biotin-responsivenessin a single blood sample, *Clin. Chim. Acta.* **145**, 151–162 (1985)
21) Packman S. Caswell N. Gonzalez-Rios MC. Kadlecek T. Cann H. Rassin D. McKay C. Acetyl CoA carboxylase in cultured fibroblasts: differential biotin dependence in the two types of biotin-responsive multiple carboxylase deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 80–92 (1984)

22) Kalousek F. Darigo MD. Rosenberg LE. Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for aprotomeric tetramer of nonidentical subunits, *J. Biol. Chem.* **255**, 60–65, (1980)
23) Oizumi J. Hayakawa K. High-performance liquid chromatographic determination of four kinds of biotin-containing carboxylase, *J. Chromatogr*. **529**, 55–63 (1990)
24) Kikuchi M. Hanamizu H. Narisawa K. Tada K. Assay of methylmalonyl CoA mutase with high-performance liquid chromatography, *Clin. Chim. Acta.* **184**, 307–314 (1989)
25) Tajima G. Sakura N. Yofune H. Nishimura Y. Ono H. Hasegawa Y. Hata I. Kimura M. Yamaguchi S. Shigematsu Y. Kobayashi M. Enzymatic diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-octenoyl-CoA production using high-performance liquid chromatography: a practical confirmatory test for tandem mass spectrometry newborn screening in Japan, *J. Chromatogr. B,* **823**, 122–130 (2005)
26) Tajima G. Yofune H. Bahagia Febriani AD. Nishimura Y. Ono H. Sakura N. A simple and rapid enzymatic assay for the branched-chain α-ketoacid dehydrogenase complex using highperformance liquid chromatography, *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 633–639 (2004)
27) Dean JA. Lange's handbook of chemistry, 14th ed. McGraw-Hill, New York, 8.58-67 (1992)
28) Damavandi MD. Chan EC. Kraus JP. Ho PC. Kang TS. Development of an UPLC-MS/MS method for assaying the enzyme activity of propionyl coenzyme-A carboxylase, *Bioanalysis,* **6**, 335–348 (2014)
29) Ghoraba DA. Mohammed MM. Zaki OK. Mutation analysis of methylmalonyl CoA mutase gene exon 2 in Egyptian families: identification of 25 novel allelic variants, *Meta. Gene.* **3**, 71–88 (2015)
30) Liu MY. Liu TT. Yang YL. Chang YC. Fan YL. Lee SF. Teng YT. Chiang SH. Niu DM. Lin SJ. Chao MC. Lin SP. Han LS. Qi Y. Hsiao KJ. Mutation profile of the MUT gene in Chinese methylmalonic aciduria patients, *JIMD Rep.* **6**, 55–64 (2012)
31) Sakamoto O. Ohura T. Matsubara Y. Takayanagi M. Tsuchiya S. Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia, *J. Hum. Genet.* **52**, 48–55 (2007)
32) Peters HL. Nefedov M. Lee LW. Abdenur JE. Chamoles NA. Kahler SG. Ioannou PA. Molecular studies in mutasedeficient (MUT) methylmalonic aciduria: identification of five novel mutations, *Hum. Mutat.* **20**, 406 (2002)
33) Rodriguez-Pombo P. Perez-Cerda C. Perez B. Desviat LR. Sanchez-Pulido L.

Ugarte M. Towards a model to explain the intragenic complementation in the heteromultimeric protein propionyl-CoA carboxylase, *Biochim. Biophys. Acta.* **1740**, 489-498 (2005)

34) Lamhonwah AM. Barankiewicz TJ. Willard HF. Mahuran DJ. Quan F. Gravel RA. Isolation of cDNA clones coding for the alpha and beta chains of human propionyl-CoA carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **83**, 4864–4868 (1986)

35) Desviat LR. Pérez B. Pérez-Cerdá C. Rodríguez-Pombo P. Clavero S. Ugarte M. Propionic acidemia: mutation update and functional and structuraleffects of the variant alleles, *Mol. Genet. Metab.* **83**, 28–37 (2004)

36) Yorifuji T. Kawai M. Muroi J. Mamada M. Kurokawa K. Shigematsu Y. Hirano S. Sakura N. Yoshida I. Kuhara T. Endo F. Mitsubuchi H. Nakahata T. Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications, *Hum. Genet.* **111**, 161–165 (2002)

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、指導教官として終始御懇なるご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科　木村和哲先生に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、幾多のご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野　川出義浩先生、前田康博先生、堀田祐志先生、名古屋市立大学大学院医学研究科　片岡智哉先生に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、サンプルの提供など様々なご協力を賜りました
藤田保健衛生大学医学部小児科　伊藤哲哉先生並びに中島葉子先生、
国立成育医療研究センターマススクリーニング研究室　但馬剛先生、
愛知医療学院短期大学リハビリテーション学科　杉山成司先生、
久留米大学医学部小児科学講座　渡邊順子先生に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、幾多のご助言、ご協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野の教室員の皆様に感謝いたします。