

## GC/MS(SIM)標準添加法による尿中メバロン酸の定量

阿部 敦子 太田 紀之 福士 勝 藤田 晃三

### 要 旨

GC/MS/SIMを用い、標準添加法による尿中メバロン酸の定量法を検討した。

前処理法は、Woolen<sup>2)</sup>らの方法に準じ、リン酸酸性で一晩放置し、尿中のメバロン酸をメバロノラクトンとし、酢酸エチルで抽出、濃縮、定容した。得られた溶液の一定量に、溶媒を加えたものと、メバロノラクトンの標準溶液を加えたものをそれぞれガスクロマトグラフに注入し、標準添加法により尿中の濃度を測定した。尿にメバロノラクトンを添加して行った添加回収試験の回収率は70.6~99.6%と良好であった。

この方法を用いて、ハイリスク検査終了後の凍結保存尿47検体についてメバロン酸濃度とクレアチニン比を定量したところ、平均値±CV%は、それぞれ、0.075 µg/ml urine ± 106%、0.24 µg/mg Creatinine ± 73.3% であり、症状と尿中メバロン酸濃度との間に特に関連性は見られなかった。また、定期的に発熱を繰り返す男児の尿中メバロン酸濃度とクレアチニン比は、それぞれ0.060 µg/ml urine、0.036 µg/mg Creatinineと平均値よりも低く、Hyper-IgD syndromeは否定的であった。

### 1. 緒 言

メバロン酸は、コレステロールの前駆物質であり、イブレノイド合成過程におけるメバロネートキナーゼ欠損症が知られている。この中には、重症の精神運動発達障害を伴うものの他、Hyper-IgD syndromeと呼ばれ、発熱、嘔吐、下痢などの発作を繰り返すものなど、さまざまな病態がある。重症の場合、尿中に多量のメバロン酸が出現し、羊水中のメバロン酸定量により、出生前診断された例もあり、メバロン酸定量は上記疾患の診断に有用とされている。

定量方法については、Hoffmann<sup>1)</sup>ら、Woolen<sup>2)</sup>らがいずれも安定同位体希釈法でGC/MSを用いる方法を報告しているが、今回は、標準添加法によりマトリクスの影響を除去し、SIMで定量する方法を検討した。また、ハイリスクスクリーニング検査目的で受け付けた有症患者47人の検体と、Hyper-IgD

syndrome疑いの男児の尿中メバロン酸濃度を測定したので報告する。

### 2. 方 法

#### 2-1 試 薬

酢酸エチル，アセトン，無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用試薬

リン酸二水素一カリウム，リン酸一水素二ナトリウム，リン酸二水素一ナトリウム：試薬特級

水：Milli-Q SP TOC(ミリポア社製)で精製

1 M リン酸緩衝液(pH2)：リン酸二水素一カリウム136 g を水500mlに溶かし、リン酸でpH2にあわせた後、1 Lに定容した

40%硫酸ナトリウム含有0.2Mリン酸緩衝液(pH7)：無水硫酸ナトリウム200 g に、305mlの0.2Mリン酸二ナトリウム溶液と195mlの0.2Mリン酸一ナトリウム溶液を加え溶かした。

メバロノラクトン標準品：和光純薬製Pr.G

メバロノラクトン標準原液：1000 μg/ml 水溶液  
(冷蔵保存)

シリンジスパイク用メバロノラクトン標準溶液：  
20 μg/ml アセトン溶液 (冷蔵保存)

## 2-2 装置

質量検出器付きガスクロマトグラフ：QP2010 (島津社製)

## 2-3 方法

### (1) 試料溶液の調製

尿1.5mlを10mlの共栓付ガラス遠沈管に採り、1 Mリン酸緩衝液(pH2) 2mlを加え攪拌した後、室温で一夜(6時間~16時間)放置した。これに無水硫酸ナトリウム2gと酢酸エチル3.5mlを加え、10分間振とう抽出し、3000rpm5分遠心分離後酢酸エチル層3mlを別な遠沈管に分取した。水層に酢酸エチル3.5mlを加え、同様に振とう、遠心分離を行い、酢酸エチル3.5mlを1回目の酢酸エチル層に合わせた。これに、40%硫酸ナトリウム含有0.2Mリン酸緩衝液(pH7)4mlを加え、軽く攪拌した後、3000rpm5分遠心分離し、酢酸エチル層6mlを10mlの共栓付ガラス遠沈管(スピッツ)に移した。窒素気流下、40℃で酢酸エチルを留去し、乾固させた後、アセトン150 μlに溶解させた。この溶液50 μlにアセトン50 μlを加え混合したものを試料溶液、この溶液50 μlにシリンジスパイク用メバロノラクトン標準溶液50 μlを加え混合したものをシリンジスパイク溶液とした。

### (2) GC測定条件

カラム：DB-5 (0.25mm X30m X膜厚1.0 μm)

カラム温度：60 (1min)-25 /min-150 (1min)-15 /min-210 (0min)- 30 /min-270 (5min)

注入口：200 スプリットサンプリング時間：1min

キャリアガス：He (線速度 42.4cm/sec)

インターフェイス温度：280 イオンソース温度：200

注入量：1 μl

SIMモダリティm/z：53,58,71,85,103

### (3) 定量

試料溶液のクロマトグラム(ピーク面積をAareaとする)シリンジスパイクのクロマトグラム(ピーク

面積をBareaとする)を図1, 2に示した。

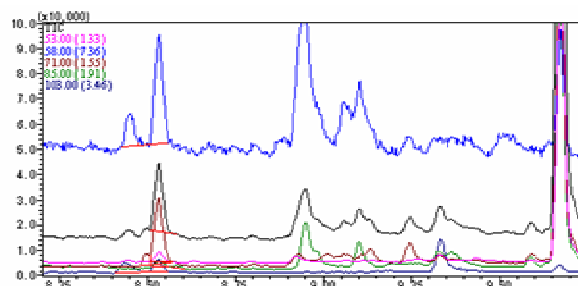


図1 GC/SIMクロマトグラム(試験溶液)

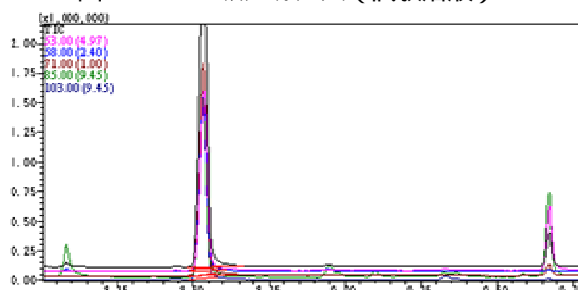


図2 GC/SIMクロマトグラム(シリンジスパイク溶液)

各々のマスクロマトグラムから得られたピーク面積を用い、以下の計算式から尿中メバロノラクトン濃度を算出した。

尿中のメバロン酸濃度 (μg/ml urine)

$$= \frac{\text{Aarea}}{(\text{Barea} - \text{Aarea})} \times \frac{1}{0.5}$$

尿中クレアチニンの測定には、Jaffe法を用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 添加回収試験の結果

尿にメバロノラクトン標準原液を添加し、添加回収試験を行った。結果を表1に示した。

表1 尿中メバロノラクトンの回収率の比較

amount *	Recovery of mevalonolactone spiked in urine				
	m/z=53	m/z=58	m/z=71	m/z=85	m/z=103
0.1Ug	32.9%	97.2%	95.1%	84.1%	92.8%
0.3Ug	78.4%	77.8%	75.4%	63.2%	126.4%
1Ug	102.6%	102.6%	99.6%	105.1%	100.1%
10Ug	65.8%	66.6%	70.6%	63.2%	64.6%

\* Ug/0.5ml urine

m/z=53, 85, 103などの感度が低いイオンでは、回収率にばらつきが生じたが、概ね良好であった。今後の測定には、一番感度が高いm/z=71のイオンを用いることとした。

### 3-2 ハイリスク検体の測定結果

2005年12月から2006年3月までに受け付けたハイリスク依頼検査の尿検体を、症状が偏らないように47件選択し、測定を行った。

年齢の分布は、生後2日から55歳で平均3.2歳、年齢と尿中メバロン酸濃度との相関係数は0.355、クレアチニン比との相関係数は-0.128であり、相関はほとんど無かった。

尿中メバロンラクトン濃度、及びクレアチニン比の平均値±CV%は、それぞれ、0.075 µg/ml urine ± 106%、0.24 µg/mg Creatinine ± 73.3%であった。さらに、性別、症状の有無により集計した結果を図3, 4に示した。尿中メバロンラクトン濃度平均値だけを見ると、痙攣がある群は無い群の半分、逆に身体発育不全と運動障害がある群は、無い群の2倍程度の差があったが、いずれも、個人のばらつきが大きいいため、一定の傾向があるとは言えないと思われる。

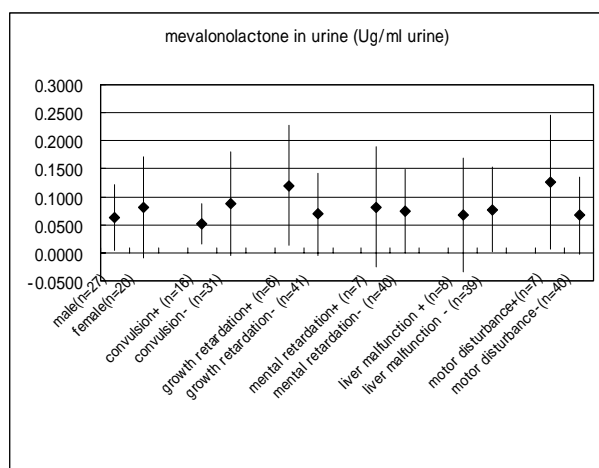


図3 性別、症状別尿中メバロンラクトン濃度

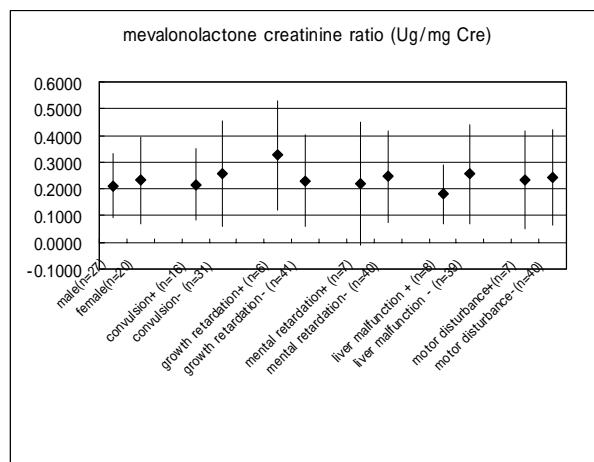


図4 性別、症状別尿中メバロンラクトンクレアチニン比

### 3-3 Hyper-IgD syndrome疑いの男児の結果

メバロン酸濃度とクレアチニン比は、それぞれ、0.060 µg/ml urine、0.036 µg/mg Creatinineと平均値よりも低くHyper-IgD syndromeは否定的であった。

## 4. 結 語

高価な同位体を用いずにGC/MSにより尿中メバロンラクトン定量することができ、およそその正常値を求めることができた。

今後は、得られた知見を代謝異常症の診断に役立てていきたい。

## 5. 文 献

- 1) Hoffmann GF, Sweetman L, Bremer, et al : Facts and artifacts in mevalonic aciduria: development of a stable isotope dilution GC/MS assay for mevalonic acid and its application to physiological fluids, tissue samples, prenatal diagnosis and carrier detection , Clin Chim Acta 198-209, 1991
- 2) B.H. Woollen, P.C. Holme, W.J. Northway, et al : Determination of mevalonic acid in human urine as mevalonic acid lactone by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr, B 760, 179-184, 2001

## Determination of Mevalonolactone in Urine by GC/MS(SIM) Using Standard Addition Method

Atsuko Abe, Noriyuki Ohta, Masaru Fukushi and Kozo Fujita

Analytical method of mevalonolactone without using stable isotope was examined. Sample was prepared as the report described by Woollen B.H. et al.

1.5ml of urine was taken into 10ml glass centrifuge tube, and incubated with 2ml of phosphate buffer (1M,pH2) for 6-12 hours at room temperature. Mevalonolactone was extracted by ethyl acetate twice, and ethyl acetate layer was washed by phosphate buffer (0.2M, pH7, containing 40% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ethyl acetate was evaporated to dryness by heating (40 °C) and mild nitrogen stream. Residue was dissolved by 150 μl acetone, and 50 μl aliquot was transferred to 2 sample vials. One was mixed with 50 μl of acetone, and another was mixed with 50 μl of 20 μg/ml mevalonolactone standard acetone solution.

Mass chromatograms of 5 different ions were taken and compared. An ion with m/z=71 which is supposed to have the least influence of obstacle peaks gave the most favorable result in recovery test, and it was used for further analysis.

Forty seven urine samples collected from high-risk patients were tested using this method. Average and CV% of mevalonolactone concentration and creatinine ratio (creatinine was measured by Jaffe method) was 0.075 μg/ml urine ± 106% and 0.24 μg/mg Creatinine ± 73.3%, respectively. Variance of sample values was large, and no relation was found between symptoms and concentration of mevalonolactone.