

アセトン血性嘔吐症尿のプロトン NMR スペクトルプロフィール

中島 寛明

浜松医科大学小児科学教室

要 旨

アセトン血性嘔吐症と考えられる 23 例の小児の尿及びそのうち 14 例の治癒後の尿について、水分子のプロトンシグナルの影響を避けるため凍結乾燥後重水に溶解し、さらに homogated decoupling 法による proton-NMR-spectroscopy を行い、そのスペクトルの特徴について検討した。3-ヒドロキシ酪酸、酢酸、アセチルカルニチン、アセト酢酸、クエン酸、クレアチニン、カルニチン、ベタイン、グリシンなどの共鳴を明瞭に認め、このうち 3-ヒドロキシ酪酸共鳴は重症なほど高値を示し、アセチルカルニチン共鳴は発症から採尿までの時間経過が長いほど高値を示し、これにともなってクエン酸共鳴が低下する傾向にあった。さらに、クエン酸共鳴は治癒後と比較して、有意に低下していた。

緒 言

Proton-NMR-spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) は、多項目の物質を一斉に、しかも簡便な方法で測定することができるために、様々な生体材料について、その応用がなされてきている¹⁾。特に尿においては、その簡便性から、様々な有機酸・アミノ酸代謝異常症等のスクリーニング的応用

の可能性が、これまでに各方面より報告されている^{2)~8)}。本研究では、代謝疾患の $^1\text{H-MRS}$ による尿スクリーニング分析の基礎的データ蓄積のひとつとして、小児における頻度の多い良性疾患でありながら、いまだ未解決の部分の多いアセトン血性嘔吐症の罹患時および回復後の尿を対象に、スペクトル中の微小な共鳴シグナルを安定的に検出する工夫を加えるとともに、そのプロフィールを検討したので報告する。

対象と方法

1994 年 6 月より 1995 年 8 月まで共立湖西総合病院小児科で尿試験紙法（ウロラプスティックス、マイルス三共）によりケトン 3+ を呈し、臨床症状及びその経過等によりアセトン血性嘔吐症と診断された 23 例（男児 18 例、女児 5 例、1~11 才、平均 5.0 ± 2.6 才）の初診時の尿、及び協力の得られた 14 例の治癒後 1 週間以上経過した健康時の尿について、 $^1\text{H-MRS}$ を行った。

採取した尿 1.0 ml を無処理で凍結乾燥後、内部基準として 0.1 mg の 3-trimethylsilylpropionate（以下 TSP と略）を含有するリン酸緩衝化重水 0.6 ml を加え、波形分離向上のために pH(D) を 7.2 に調節した。この上清を、JEOL 社製 GSX-270 WB 分光器で共鳴周波数 270 MHz, 64 回積算し、設定はパルス角 45° 、

キーワード acetone vomiting, urine, proton-NMR-spectroscopy, citrate, acetylcarnitine

掃引幅 3000 Hz, 3.0 秒間隔, サンプル採取点 16 K, 残存する水のプロトンは homogated decoupling 法で抑制し, 各信号強度の線高比を測定に用いた. 重水は Merck Frosst Inc. Montreal より, その他の標品は Sigma Chemical Co. より入手した.

結 果

Fig. 1 に, アセトン血性嘔吐症の尿の典型的な $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで, HDO シグナルより高磁場側の 1 例を示す. シグナルは, それぞれ内部基準物質である TSP からの化学シフト, ppm で表示され識別可能である. 上段 A)

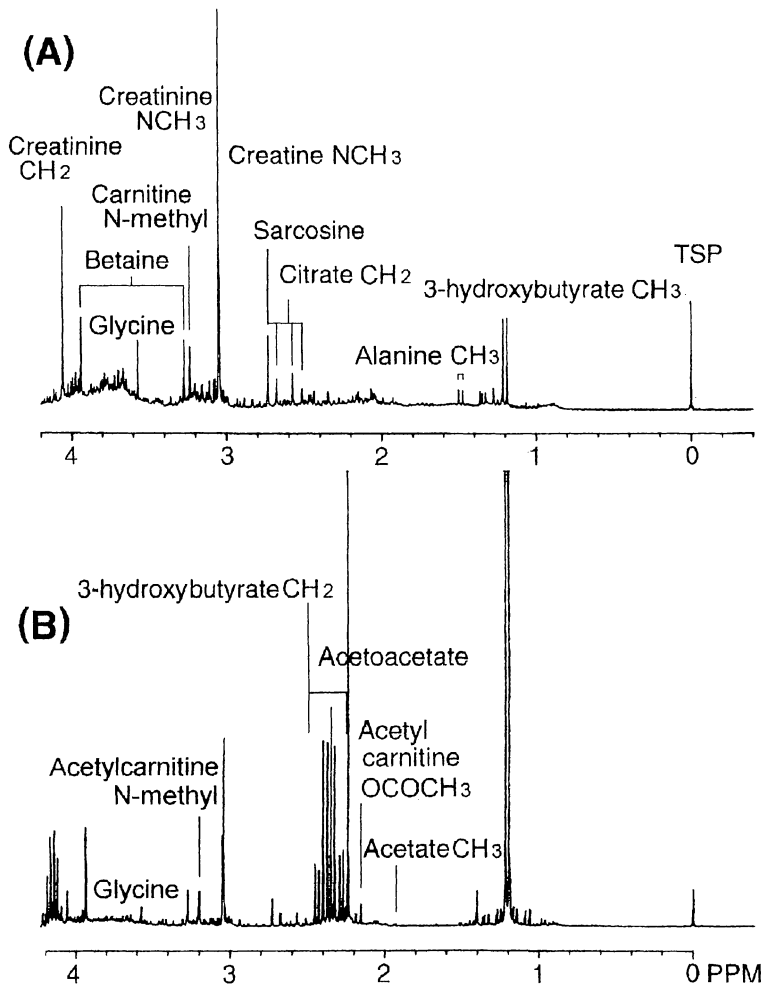


Fig. 1. Proton NMR spectra (aliphatic region) of urine a) during acetoneic vomiting and b) at recovery.

は回復後すなわち健康時と考えられる尿のスペクトルで、3-ヒドロキシ酪酸 (CH_3 ; 1.20, 1.22 ppm, doublet) が14例中8例, カルニチン (N-methyl; 3.23 ppm, singlet) が13例, クエン酸 (CH_2 ; 2.51, 2.57, 2.64, 2.70 ppm, quartet), クレアチニン (NCH_3 ; 3.05 ppm, singlet 及び CH_2 ; 4.06 ppm, singlet), ベタイン (N-methyl; 3.27 ppm, singlet 及び 3.90 ppm, singlet), グリシン (CH_2 ; 3.60 ppm, singlet) 等のシグナルが全例に明瞭に認められた。下段 B) は同じ症例の発作時のものであるが、3-ヒドロキシ酪酸のシグナルが23例全例著明に増強し、酢酸 (CH_3 ; 1.92 ppm, singlet) が9例, アセチルカルニチン (OCOCH_3 ; 2.15 ppm, singlet 及び N-methyl; 3.20 ppm, singlet) が21例, アセト酢酸 (CH_3 ; 2.24 ppm, singlet) のシグナルが全例に出現している。また、カルニチンシグナル及びクエン酸シグナルが減少して、それぞれ12例及び10例で検出不能となった。

アセト酢酸についてはシグナルの同定は可能だったが、3-ヒドロキシ酪酸のシグナル (CH_2 ; multiplet) と重複したため、またグリシンシグナルの近傍は尿に存在する様々な成分のシグナルにより複雑であり、ともに安定した測定ができなかった。Table に測定結果を示した。3-ヒドロキシ酪酸は CH_3 シグナルを、クレアチニンは NCH_3 シグナルを測定に用い、アセチルカルニチンについては、N-メチルシグナルの近傍は複雑で他のシグナル、例えばコリンなどと重複している可能性があったので、

アセチル基のメチルシグナルを測定に用いた。クエン酸シグナルは、サルコシン (メチルグリシン) のシグナル (CH_3 ; 2.72 ppm, singlet) と重複したが、4峰のうち主な2峰が重複がなく測定に用いた。Fig. 2 に、発作中と回復後のクエン酸/クレアチニン線高比を比較した。有意に (Wilcoxon 検定, $p < 5\%$), 治癒後より発作時のクエン酸が低下していた。Fig. 3 a) は発作中の尿中アセチルカルニチンと3-ヒドロキシ酪酸の, b) はクエン酸と3-ヒドロキシ酪酸の, c) はクエン酸とアセチルカルニチンの, それぞれ相関である。a) では両者に弱い正の相関が, b), c) それぞれ, 両者に弱い負の相関が見られた。さらに、これらについて、ア

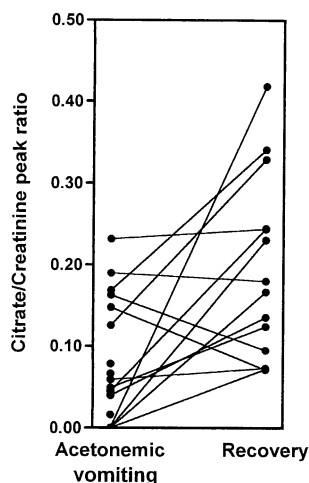


Fig. 2. Comparison of citrate CH_2 /creatinine NCH_3 peak ratio during acetonemic vomiting and at recovery.

Table. Proton Magnetic Resonance Intensities of Metabolites in Urine Samples during Acetonemic Vomiting and at Recovery

Metabolite resonances (/creatinine NCH_3 peak ratio)	During acetonemic vomiting	At recovery	CV% (n=5)
3-hydroxybutyrate CH_3	5.00 ± 4.22	0.08 ± 0.08	8.3
Acetylcarnitine OCOCH_3	0.17 ± 0.14	0.00 ± 0.00	3.7
Citrate CH_2	0.06 ± 0.07	0.19 ± 0.11	6.2
Carnitine N(CH_3) ₃	0.03 ± 0.04	0.07 ± 0.05	5.5

セトン血性嘔吐症の重症度との関係, 及び嘔吐開始から採尿までの時間経過との関係について検討した. アセトン血性嘔吐症の重症度を便宜的に, 点滴や入院の必要性の有無によって分類し, 入院を必要としたものを重症, 外来で点滴を必要としたものを中等症, 経口摂取の指導のみで軽快したものを軽症として, それぞれ比較すると, Fig. 4 a) 及び b) に示すように3-ヒドロキシ酪酸及びアセチルカルニチンは, 重症

例ほど高かったが, c) クエン酸は重症度とはあまり関連性はなかった. 一方, 嘔吐が始まった時間から採尿までの時間によって, 6時間ごとに4群に分類すると, Fig. 5 a) のように3-ヒドロキシ酪酸は時間経過とあまり関連しないが, b) 及び c) のように, 採尿までの時間経過が長いものほどアセチルカルニチンは高く, 一方クエン酸は低下する傾向にあった.

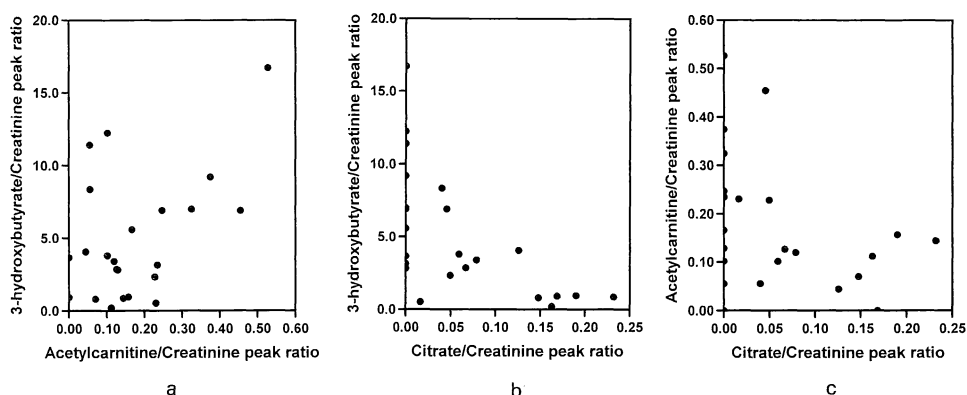


Fig. 3. Relationship between a) acetylcarnitine and 3-hydroxybutyrate, b) citrate and 3-hydroxybutyrate, and c) citrate and acetylcarnitine in urine samples during acetonemic vomiting.

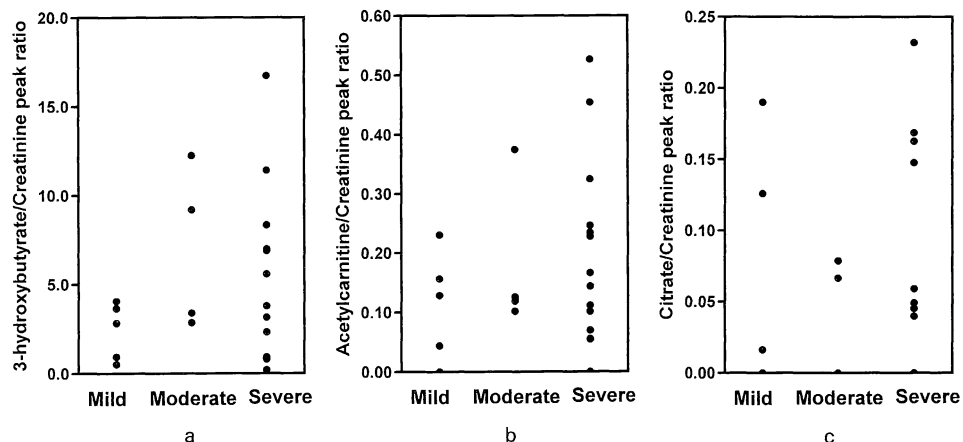


Fig. 4. Association of a) 3-hydroxybutyrate $\text{CH}_3/\text{creatinine NCH}_3$ peak ratio, b) acetylcarnitine $\text{OCOCH}_3/\text{creatinine NCH}_3$ peak ratio and c) citrate $\text{CH}_2/\text{creatinine NCH}_3$ peak ratio with the clinical severity during acetonemic vomiting.

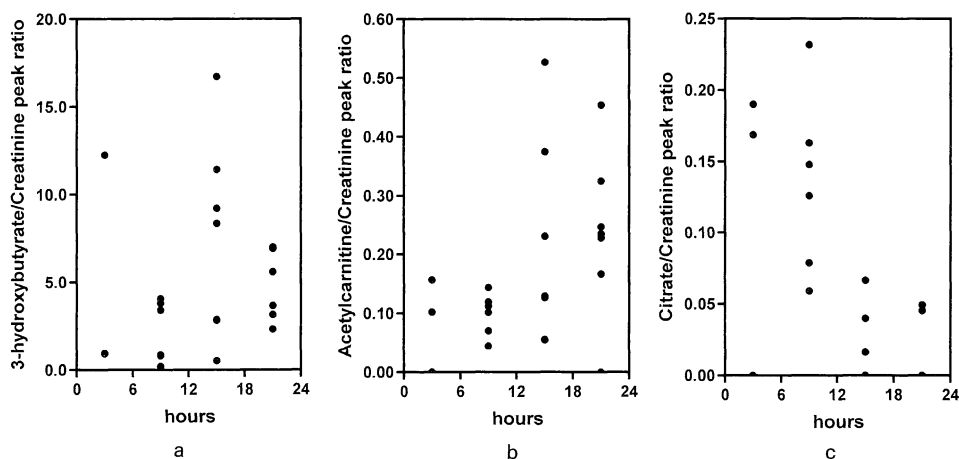


Fig. 5. Association of a) 3-hydroxybutyrate CH_3 /creatinine NCH_3 peak ratio, b) acetylcarntine OCOCH_3 /creatinine NCH_3 peak ratio and c) citrate CH_2 /creatinine NCH_3 peak ratio with the sampling time during acetone vomiting.

考 案

$^1\text{H-MRS}$ においては、測定の簡便性の一方で、各シグナルが複雑に重複しあうことによる帰属の困難さと、抽出に由来する水のプロトン共鳴が測定結果に強い影響を与えることなどが問題になる。前者については、本研究ではカルニチン N -メチル基周辺のシグナル分離のために pH(D) を 7.2 に調節した^{9),10)}。測定物質によってはその化学交換プロトン共鳴の強度や化学シフトの安定のために、 pH(D) を酸性側に設定している報告も見られる²⁾。後者の大きな水の吸収の問題については、単に吸収の幅のみでなく、ダイナミックレンジに関して微小なシグナル強度を不安定にし¹¹⁾、このことが $^1\text{H-MRS}$ の感度をさらに悪化せしめ、応用の幅を狭める一因となっていると考えられる。これについては、尿素¹¹⁾や塩化アンモニウム¹²⁾を利用する方法などが報告されているが、本研究では凍結乾燥による重水置換後、さらに残存する水分子に由来するシグナルを homogated decoupling 法を用いて抑制する方法を採用した。この方法によって、凍結乾燥による揮発性

物質の損失という問題と、サンプル中に含まれる物質に化学交換可能なプロトンが存在する場合、その共鳴の重水による吸収強度の減少が欠点となる¹³⁾。これについては、今回測定した物質については、対象とした官能基、処理時間等から問題は少ないと考えられ、この簡単確実な方法によって微小なシグナル強度が安定した。しかしながら、今回の検討においては、サンプル間の完全緩和条件が未検討であり、それぞれの T_1 にサンプル間の差がないとの仮定にもとづいている。これら諸問題については、 $^1\text{H-MRS}$ の使用目的、および目的とする物質の性質に応じた工夫が必要で、さらに今後の検討の蓄積が必要である。

本研究では、アセトン血性嘔吐症と考えられる 23 例を対象とした。男児が非常に多く、11 才と比較的年長児が含まれていたが、年齢分布(不提示)は概ねこれまでの報告¹⁴⁾に合致していた。また、結果的に、それぞれのスペクトルにおいて異常蓄積物質は検出されず、今回対象にした症例には、既に報告されているような代謝異常症は含まれていなかった。また、治癒後のスペクトルはこれまでの健康人の尿における

報告¹³⁾に一致していた。尿中ケトン体の定性結果と血中3-ヒドロキシ酪酸値との間に乖離を生ずることが少なくないことが報告されており¹⁵⁾、必ずしも病勢が今回の尿中ケトン体測定値と一致しない可能性がある。本研究の結果においても、全体としては尿中3-ヒドロキシ酪酸値は重症度なほど高値を示したが、3-ヒドロキシ酪酸値の分散が大きかったことは、尿中排泄量が血中濃度を必ずしも反映していない可能性があると考えられる。

香坂によれば、アセトン血症性嘔吐症においては、TCA サイクル活性の低下と血中アラニン値の低下、重症例や遷延例での低血糖がみられる¹⁴⁾。今回、発作時の尿中クエン酸が健康時に比して有意に低下しており、さらに尿中3-ヒドロキシ酪酸及びアセチルカルニチンのより高度な症例では、尿中クエン酸が低下している症例が多い傾向が認められた。さらに、尿中クエン酸は重症度と時間経過の2つのパラメータでみると、より時間との関連が強く、発症からの時間経過に従って低値になることが示された。糖尿病性ケトosis症例では、その最初の8時間ではクレアチニンに対するクエン酸排泄量はほとんど変化がないとされている¹⁶⁾。また、尿中に存在するTCA回路の成分は、その血中濃度を反映せず、尿細管における代謝を反映する可能性と、尿細管における酸塩基平衡の影響を受けることが知られている¹⁷⁾が、今回のクエン酸低下もこのいずれかまたは両者によると考えられる。また、健康時のスペクトルにはアセチルカルニチンがほとんど検出されない一方、発作時にはほとんどの例でアセチルカルニチンが検出されるようになり、反対に、遊離カルニチンは減少し、アセチルカルニチン/遊離カルニチン比は高値となった。さらに、この傾向は、時間経過に伴って強くなり、それに伴って尿中クエン酸値が低下していると考えられる。カルニチンはアセチル基のバッファになっており¹⁸⁾、遊離カルニチンはピルビン酸脱水素酵素複合体活性を促進し、反対にア

シルカルニチンの増加は抑制的に働き、解糖系からの流入を調節している¹⁹⁾とされている。また、このことは、アセトン血性嘔吐症でTCA サイクル活性及び糖代謝が低下するとする報告¹⁴⁾とも矛盾しない。尿中代謝産物が血中濃度を反映しないとしても、尿細管細胞内代謝の反映^{17),20)}であるとすれば、以上のことで、本研究に示されたアセトン血性嘔吐症の発症後時間経過に従う、アセチルカルニチンの増加の傾向と、尿中クエン酸値の低下を説明できるかもしれない。なお、アセチルカルニチン以外のアシルカルニチンについては、今回対象にした尿の測定条件においては検出感度以下であり、飢餓状態における尿の¹H-MRSの検討結果と一致しており²¹⁾、プロピオン酸血症などにおける報告と対照的である。

これまで¹H-MRSによって多くの先天性代謝異常症が検出可能と報告されている^{2)~7),23)}が、¹H-MRSの感度の低さなどの問題によって、その臨床応用に対しては否定的な見方が強い。しかし、水のプロトン共鳴の影響の減弱をはじめとした測定感度の改善等、技術的な改良を加える事によって、非常に簡便な手技で構成する代謝物質の量的質的な評価を行うことが可能であることから、¹H-MRSは、代謝異常症検出に、最良ではなくとも簡便な臨床手段となる可能性があり、さらなる知見の蓄積が必要と思われる。

謝 辞

本論文の執筆にあたって、貴重な助言と、また御校閲を下さいました、浜松医科大学小児科学教室五十嵐良雄教授並びに同化学教室藤瀬裕教授に深謝致します。

文 献

- 1) Bock JL: Nuclear magnetic resonance in the clinical laboratory. Am J Clin Pathol, 91 (Suppl

- 1) : S19-S26, 1989.
- 2) Lehnert W, Hunkler D : Possibilities of selective screening for inborn errors of metabolism using high-resolution ^1H -FT-NMR spectrometry. *Eur J Pediatr*, 145 : 260-266, 1986.
- 3) Yamaguchi S, Koda N, Eto Y et al. : Rapid screening of metabolic disease by proton NMR urinalysis. *Lancet*, Aug : 4, 1984.
- 4) Iles RA, Buckingham MJ, Hawkes GE : Spin-echo proton-nuclear-magnetic-resonance detection of normal and abnormal metabolites in plasma and urine. *Biochem Soci Trans*, 11 : 375, 1983.
- 5) Davies SEC, Iles RA, Stancey TE, et al. : Carnitine therapy and metabolism in the disorders of propionyl-CoA metabolism studied using ^1H -NMR spectroscopy. *Clin Chim Acta*, 204 : 263-278, 1991.
- 6) Iles RA, Hind AJ, Chalmers RA : Use of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy in detection and study of organic acidurias. *Clin Chem*, 31 : 1795-1801, 1985.
- 7) Iles RA, Chalmers RA, Hind AJ : Methylmalonic aciduria and propionic acidemia studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chim Acta*, 173 : 173-189, 1986.
- 8) Burns SP, Woolf DA, Leonard JV, et al. : Investigation of urea cycle enzyme disorders by ^1H -NMR spectroscopy. *Clin Chim Acta*, 209 : 47-60, 1992.
- 9) Quirk PG, King GF, Campbell ID, et al. : Quantitation of metabolites of isolated chicken enterocytes using NMR spectroscopy. *Am J Physiol*, 256 : G423-G429, 1989.
- 10) Nakajima H, Sugie H, Tsurui S et al. : Application of ^1H -NMR spectroscopy for qualitative measurement of muscle carnitine levels. *Clin Chim Acta*, 224 : 81-88, 1994.
- 11) Connor S, Everett J, Nicholson JK : Spin-echo proton NMR spectroscopy of urine samples. Water suppression via a urea-dependent T_2 relaxation process. *Magn Reson Med*, 4 : 461-470, 1987.
- 12) Brown JCC, Mills GA, Sadler PJ, et al. : ^1H NMR studies of urine from premature and sick babies. *Magn Reson Med*, 11 : 193-201, 1989.
- 13) Bales JR, Higham DP, Howe I, et al. : Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem*, 30 : 426-432, 1984.
- 14) 香坂隆夫 : アセトン血症性嘔吐症. 新小児科学体系, 17B, 中山書店, 東京, 1984, pp. 179-206.
- 15) 徳田正邦 : 小児ケトン血症における血中ケトン体の測定意義について (第1報). *日児誌*, 96(9) : 2069-2074, 1992.
- 16) Nicholson JK, O'Flynn MP, Sadler PJ, et al. : Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem J*, 217 : 365-375, 1984.
- 17) Bell JD, Sadler PJ, Morris VC, et al : Effect of Aging and Diet on Proton NMR Spectra of Rat Urine. *Magnet Reson Med*, 17 : 414-422, 1991.
- 18) Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, et al. : Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism : evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res*, 18 : 1325-1328, 1984.
- 19) Uziel G, Garavaglia B, DiDonato S : Carnitine stimulation of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) in isolated human skeletal muscle mitochondria. *Muscle Nerve*, 11 : 720-724, 1988.
- 20) Guder WC, Wagner S : The Role of the Kidney in Carnitine Metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem*, 28 : 347-350, 1990.
- 21) Bales JR, Bell JD, Nicholson JK, et al. : ^1H NMR studies of urine during fasting : excretion of ketone bodies and acetylcarnitine. *Magn Reson Med*, 3 : 849-856, 1986.
- 22) 山本英明, 山口修一 : ^1H -NMR 尿分析によるアミノ酸代謝異常症, 有機酸代謝異常症同時スクリーニング法の研究. *臨床病理*, 36(2) : 182-190, 1988.

Proton NMR Spectrum Profile of Urine during Acetonemic Vomiting

Hiroaki NAKAJIMA

*Department of pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine
3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-31*

Proton NMR spectra were analyzed to elucidate metabolites in urine samples during acetonemic vomiting (23 cases) and at recovery (14/23 cases). In order to water-resonance suppression, the urine samples were dissolved in D₂O after lyophilized and the spectra were acquired by the application of homogated decoupling method. Intense resonances of 3-hydroxybutyrate, acetate, acetylcarnitine, citrate, creatinine, carnitine, betaine, glycine and other metabolites, were clearly detected in the NMR spectra of urine samples collected during acetonemic vomiting. Citrate CH₂/creatinine NCH₃ peak ratio during acetonemic vomiting was significantly lower than that at recovery (Wilcoxon, $p < 5\%$). 3-hydroxybutyrate CH₃/creatinine NCH₃ peak ratio during acetonemic vomiting was high in clinically severe cases. However, the increase in acetylcarnitine OCOCH₃/creatinine NCH₃ peak ratio and the decrease in citrate CH₂/creatinine NCH₃ peak ratio during acetonemic vomiting depended more on the time course than on the severity of the disease.