

LC-MS/MS を用いた牛尿中における 2,8-ジヒドロキシアデニンの分析

Determination of 2,8-Dihydroxyadenine in Cattle Urine Using LC-MS/MS

藤井 良昭 鈴木 省吾* 鈴木 竹彦* 上田友紀子
大前 詩穂 青柳 直樹 西村 一彦

Yoshiaki FUJII, Shogo SUZUKI, Takehiko SUZUKI, Yukiko UEDA,
Shiho OMAE, Naoki AOYANAGI and Kazuhiko NISHIMURA

Key words : 2,8-dihydroxyadenine (2,8-ジヒドロキシアデニン) ; cattle (牛) ; urine (尿) ;
LC-MS/MS (液体クロマトグラフータンデム型質量分析計)

緒 言

2,8-ジヒドロキシアデニン (DHA) は、ヒトでアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症により蓄積し、尿路結石や尿細管沈着による腎障害をはじめとする泌尿器系の疾患を引き起こす水溶性が低い物質である¹⁾。今般、と畜検査において、牛の肝門リンパ節及び肝臓に緑白色調変色等の特異的な病変が複数例認められ、偏光顕微鏡や溶解性試験から、これらは DHA 沈着によるものと推察された。しかし、牛の DHA 蓄積に関する報告例は稀であったことから²⁾、診断を確定するには、DHA を直接検出することが重要と考えられた。

これまでヒトでは結石や尿中 DHA を直接分析した事例はあるものの^{3,4)}、牛のこれらを対象とした事例はほとんどない²⁾。そこで、Thorsteinsdottir ら³⁾ の LC-MS/MS を用いたヒト尿中 DHA 分析法が牛尿中 DHA 分析に適用可能か検討した。しかし、試験溶液の保存中に加水分解と考えられる DHA 濃度低下が認められ、定量分析精度の低下が懸念された。そこで、試験溶液中の DHA 分解を抑制する方法、さらに LC-MS/MS 分析条件を検討して牛尿中 DHA 分析法を新たに構築し、実試料の分析を行った。我々が知る限り、本検討は牛尿中 DHA の定量分析を試みた初の事例である。

方 法

1. 試料

牛から採取した尿を用いた。DHA 結石症疑い 5 検体、別の結石症 2 検体、健常体 5 検体を、分析まで -30℃ で保

管した。なお、DHA 結石症疑いの 1 検体は析出物が認められたため、試験溶液の調製前に 5 分程度超音波処理を行い試料とした。

2. 試薬・試液

DHA 標準品は Toronto Research Chemicals 社製を用いた。試薬は関東化学(株)製 LC/MS 用アセトニトリル及びメタノール、富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用ギ酸及び特級アンモニア水、Honeywell 社製 LC/MS 用ギ酸アンモニウムを用いた。

3. 標準溶液

標準溶液は、DHA を 1 mg はかりとり、0.1 mol/L アンモニア含有 40% メタノールに溶解して 10 µg/mL となるよう調製し、-30℃ で保管した。

4. 装置

LC は Agilent Technologies 社製 1260 Infinity II LC を用い、MS/MS は同じく Agilent Technologies 社製 6470 Triple Quadrupole LC/MS を用いた。

5. LC-MS/MS 条件

LC 分離カラムは、(株)大阪ソーダ製 CAPCELL CORE PC (2.1 × 100 mm, 2.7 µm) を用いた。移動相は A 液 0.01 mol/L ギ酸アンモニウム含有 0.2% ギ酸溶液、B 液アセトニトリルとし、次のグラジエント条件を用いた。0 分 (A 液 : B 液 = 10 : 90) - 7 分 (A 液 : B 液 = 24 : 76) - 9 分 (A 液 : B 液 = 80 : 20) - 14 分 (A 液 : B 液 = 80 : 20) - 16 分 (A 液 : B 液 = 10 : 90) - 26 分 (A 液 : B 液 = 10 : 90)。イオン化は ESI (-)、モニタリングイオンは m/z 166 → 123 (定量)、 m/z 166 → 80, 42 (確認) を用いた。オートサンプラーのクーラー温度は 4℃ とした。

6. 試験溶液の調製

尿試料 400 µL に 0.01 mol/L アンモニア含有 40% メタ

* 現 北海道帯広食肉衛生検査所

ノールを加えて 10 mL に定容した (25 倍希釈)。高濃度の場合、さらに 0.01 mol/L アンモニア含有 40% メタノールを用いて希釈した。この溶液を、15,000 rpm で遠心分離した後の上清を試験溶液とした。

7. 検量線

マトリックス標準溶液を用いて検量線を作成した。すなわち、無添加試料から「6. 試験溶液の調製」に従い調製した試験溶液 (ブランク溶液) を用いて標準溶液を希釈し、0~400 ng/mL の範囲で検量線用のマトリックス標準溶液を調製した。なお、DHA を全く含まない試料が得られなかったため、各標準溶液によるピークエリアからブランク溶液によるピークエリアをそれぞれ減じたエリア値を用いて、検量線を作成した。得られた検量線の R^2 値は 0.99 以上であった。

8. 添加回収試験

牛尿を対象とし、試料 400 μ L に DHA 標準溶液を添加した後、「6. 試験溶液の調製」に従い試験溶液を調製し、添加量に対する分析値から回収率を算定した。添加濃度は 1 及び 0.1 μ g/mL の 2 濃度、併行回数は各 5 回とした。なお、無添加試料中にも DHA が含まれていたため、添加試料のピークエリアから無添加試料のピークエリアを差し引いたエリア値から分析値を求めた。

結果及び考察

1. LC-MS/MS 条件

DHA は極性が高いため、汎用的な逆相カラムでは保持が弱く、夾雑物との分離が難しい。そこで、親水性相互作用クロマトグラフィ (HILIC) 用カラムである CAPCELL CORE PC での分離を検討した。まず、移動相 A 液 0.01 mol/L ギ酸アンモニウム及び 0.2% ギ酸、B 液 アセトニトリルとし、アイソクラティック条件で移動相 B 液の割合を 50、70、80 及び 90% とし、DHA の保持を確認した。この結果、80% から保持が強くなり、保持時間は 50% の 1.0 分に対して、80% では 2.4 分、90% では 10.6 分であった。また、移動相 B 液割合の高い方が、DHA ピーク強度が強くなり、50% のピークエリア値に対して、80% では 8 倍、90% では 20 倍まで増加した。すなわち、HILIC 用カラムを用いることで、良好な保持を得ることができ、さらにより高感度に分析可能であることが示唆された。しかし、移動相 B 液割合 90% ではピーク形状の悪化が認められ、さらに尿から調製した試験溶液を分析したところ、DHA と同じ m/z をもつ夾雑物ピークの重なりが認められた。そこで、グラジエント条件による改善を検討した結果、移動相 B 液の割合を初期 90% から 2%/分で減らす条件とすることで、良好なピーク形状及び夾雑物ピークとの完全分離が可能となった。

2. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、Thorsteinsdottir ら³⁾と同様に、希釈溶媒にアンモニア水を用い、尿を希釈するのみの簡便な方法の採用を検討した。しかし、標準溶液をアンモニア水で希釈し調製したところ、オートサンプラー保管時の冷暗

所 (4 $^{\circ}$ C) でも DHA 濃度の低下が認められた。pH を 8.6 に調整することで分解を抑制できることが報告されているが³⁾、我々が検討した結果では分解を抑制することはできず、報告と異なる結果を示した原因を特定することもできなかった。精度よく定量分析を行う上では、分解しない溶媒に溶解することが最善ではあるものの、DHA は有機溶媒や中性・酸性溶液には溶解しにくいいため、分解しやすくとともにアルカリ性溶液に溶解せざるを得ない状況にある。そこで、アルカリ性溶液における DHA 分解を可能な限り抑制するために、希釈溶媒について検討を行った。まず、アンモニア濃度の違いによる分解への影響を確認した。すなわち、0.01、0.03、0.05、0.10 及び 0.15 mol/L アンモニア水に DHA を添加し、24 及び 48 時間後の濃度変化を分析した (図 1)。保管温度は、尿試料を希釈した後に速やかにオートサンプラー中で冷却保管することを想定して 4 $^{\circ}$ C とした。この結果、アンモニア濃度を下げると分解を抑制できるが、低濃度の 0.01 mol/L アンモニア水でも、24 時間で 6%、48 時間で 26% の分解が認められた。このため、追加の分解抑制方法を検討することとした。すなわち、保管温度は上記と同じ 4 $^{\circ}$ C、アンモニア濃度は上記で分解が最も抑えられた 0.01 mol/L とし、0% (メタノール無し) と 10、30 及び 50% メタノール溶液中に DHA を添加し、24 及び 48 時間後の濃度変化を分析した (図 2)。この結果、30 及び 50% メタノールにおける DHA の分解は、24 時間後では 4 及び 3%、48 時間後では 10 及び 9% (メタノール

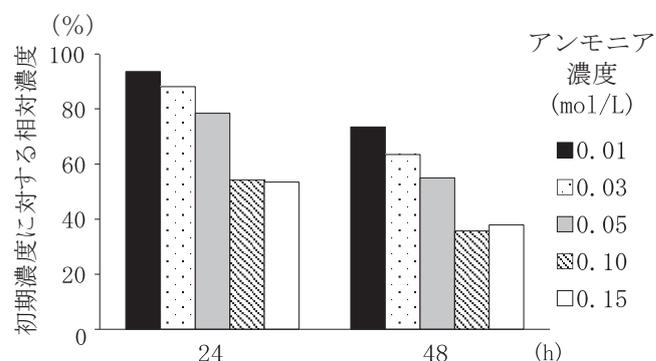


図 1 アンモニア濃度による DHA 濃度の変化

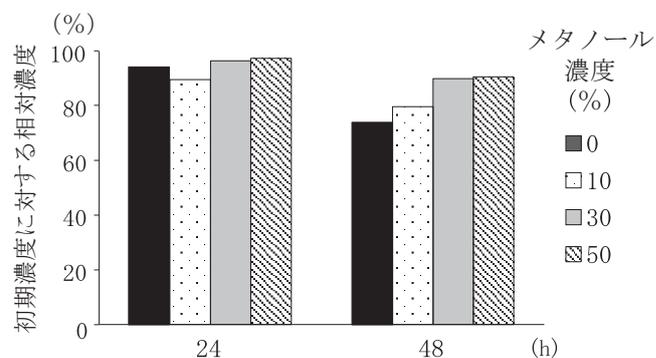


図 2 メタノール濃度による DHA 濃度の変化
溶液にはアンモニアを 0.01 mol/L 含む

ル無しと比較して、半分以下)であり、溶液中のメタノール濃度を高めることで、DHAの分解を抑制可能であることが示唆された。一方で、標準溶液の調製にアンモニア含有90%メタノールを用いた場合、DHAを完全には溶解できなかったことから、メタノール濃度の上昇はDHAの溶解度を低下させると考えられた。また、標準溶液を-30℃で保管する場合、溶液が凝固しないようにするには、メタノール割合を37%以上にする必要がある。以上のことから、希釈溶媒にはアンモニア含有40%メタノールを用いることとした。

3. 添加回収試験

牛尿試料を対象にDHA濃度1及び0.1 µg/mLの2濃度、各5併行で添加回収試験を実施した。この結果、それぞれ平均回収率93及び95%、併行精度8.9及び4.9%と、両濃度ともに良好な結果が得られた。これより、本法は牛の尿中DHAを分析する方法として、真度及び精度ともに良好な結果が得られる有用な方法と考えられた。

4. 試料分析

本試験法を用い、DHA結石症疑い及び別の結石症の牛から得た尿、さらに健常体の尿を分析した結果を表1に、クロマトグラムの例を図3に示す。DHA結石症疑いの尿試料からは、15~127 µg/mLと高濃度のDHAが検出された。このうち、DHA濃度が最高値の試料には析出物が

認められており、この析出物はDHA結晶またはDHAを高濃度に含有する結晶と推察した。一方、別の結石症及び健常体の尿からも0.06~0.35 µg/mLの低濃度のDHAが検出された。これらの結果より、DHA結石症疑いの牛尿中には、他の結石症や健常体の数十~数百倍高い濃度のDHAを含有することが示唆された。なお、これらDHA結石症疑いの牛尿中DHA濃度は、ヒト尿での報告例と同様に³⁾、水の飽和濃度(中性で約2 µg/mL)よりも高いことが明らかとなった。

文 献

- 1) 久原とみ子, 大瀬守真: アデニンフォスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症の診断のガイドラインに関する考察—GC/MS-尿メタボロミクスを診断の入り口と確定診断に—, 痛風と尿酸・核酸, **44**, 167-175 (2020)
- 2) McCaskey PC, Rigsby WE, Hinton DM, Friedlander L, Hurst VJ: Accumulation of 2,8-dihydroxyadenine in bovine liver, kidneys, and lymph nodes. *Vet. Pathol.*, **28**(2), 99-109 (1991)
- 3) Thorsteinsdottir M, Thorsteinsdottir UA, Eiriksson FF, Runolfsson HL, Agustsdottir IMS, Oddsdottir S, Sigurdsson BB, Hardarson HK, Kamble NR, Sigurdsson ST, Edvardsson VO, Palsson R: Quantitative UPLC-MS/MS assay of urinary 2,8-dihydroxyadenine for diagnosis and management of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1036-1037**, 170-177 (2016)
- 4) Runolfsson HL, Palsson R, Thorsteinsdottir UA, Indridason OS, Agustsdottir IMS, Oddsdottir GS, Thorsteinsdottir M, Edvardsson VO: Urinary 2,8-Dihydroxyadenine Excretion in Patients with APRT Deficiency, Carriers and Healthy Control Subjects. *Mol. Genet. Metab.*, **128**(1-2), 144-150 (2019)

表1 DHA分析結果

検体分類	n	平均	最大	最小
DHA結石症疑い	4	48.62	126.79	14.90
別の結石症	2	0.07	0.07	0.06
健常体	5	0.24	0.35	0.14

単位: µg/mL

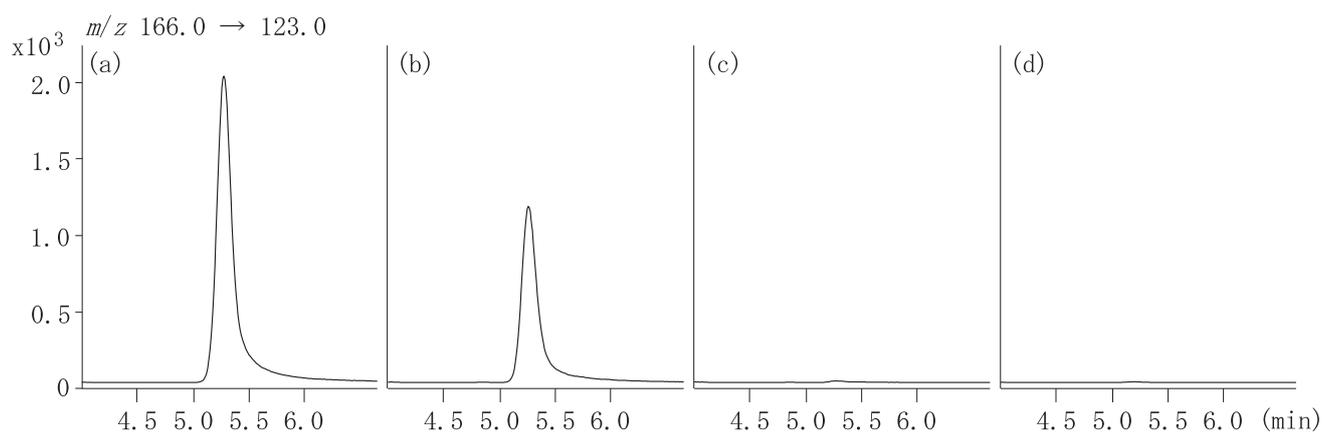


図3 DHA分析結果のクロマトグラム例

(a) 標準溶液 (300 ng/mL)、(b) DHA結石症疑い、(c) 別の結石症、(d) 健常体