

폼페병의 진단 및 치료효과 확인을 위한 초고성능 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기를 이용한 소변 포도당 사당류(Glc₄) 측정법의 평가

Evaluation of the Urinary Glucose Tetrasaccharide Assay Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Diagnosis of Pompe Disease

남영원^{1,2} · 이경훈^{1,2} · 전선희³ · 박경운^{1,2,3} · 송상훈^{1,2} · 박형두⁴ · 송정한^{1,2,3*}

Youngwon Nam, M.D.^{1,2}, Kyunghoon Lee, M.D.^{1,2}, Sun-Hee Jun, M.T.³, Kyung-un Park, M.D.^{1,2,3}, Sang Hoon Song, M.D.^{1,2}, Hyung-Doo Park, M.D.⁴, Junghan Song, M.D.^{1,2,3}

서울대학교 의과대학 검사의학교실¹, 서울대학교병원 진단검사의학과², 분당서울대학교병원 진단검사의학과³, 성균관대학교 의과대학 진단검사의학교실⁴

Department of Laboratory Medicine¹, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Seoul National University Hospital, Seoul; Department of Laboratory Medicine³, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam; Department of Laboratory Medicine & Genetics⁴, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

We evaluated the urinary glucose tetrasaccharide (Glc₄) assay using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The calibration curve was linear over a range of 5-500 μ mol/L. Performance parameters such as intra- and inter-day imprecision CVs were 6.52-14.6% and 11.5-13.2%, respectively. The mean concentrations of urinary Glc₄ in 27 normal controls and 3 pseudodeficiency patients were 1.5 and 12.1 mmol/mol creatinine, respectively. Urinary Glc₄ concentration in a patient with Pompe disease was 171.3 mmol/mol creatinine, which decreased to 130.9 mmol/mol following enzyme replacement therapy. Based on our results, we suggest that the urinary Glc₄ assay using UPLC-MS/MS can be a reliable diagnostic tool for identification of patients with Pompe disease.

Key Words: Glucose tetrasaccharide (Glc₄), UPLC-MS/MS, Pompe disease

폼페병(Pompe disease)은 제2형 당원축적병으로, 리소좀 산성 알파-글루코시데이스(lysosomal acid α -glucosidase, GAA)의 결핍으로 인해 나타나며 심근과 골격근을 침범하는 것으로 알려져 있다[1, 2]. 여러 임상 연구에서 재조합 인간 산성 알파-글루코시데이스(recombinant human acid α -glucosidase)를 이용한 효소대체치료법을 빨리 시행할수록 폼페병의 증상 호전에 도움이 되는 것

로 입증되면서, 폼페병을 조기에 진단하기 위한 검사의 중요성은 더욱 강조되고 있다[3]. 이 질환을 확실히 진단하기 위해서는 GAA 효소활성측정법으로 GAA의 결핍이 증명되어야 하지만[4], 이 측정법은 폼페병과 GAA의 가성결핍(pseudodeficiency)을 정확히 구분하는 데 어려움이 있기 때문에 단독으로 확진 검사로 쓰이기에는 한계가 있다[5]. 특히 일본을 비롯한 동아시아 국가에서 GAA의 가성결핍 환자들의 유병률이 서구보다 더 높은 것으로 알려져 있어 효소활성측정법만으로 폼페병을 진단하는 것은 부적합하다는 문헌들이 발표되었다[5-8].

소변 포도당 사당류(urinary glucose tetrasaccharide, 6- α -D-glucopyranosyl-maltotriose, Glc₄)는 폼페병을 비롯한 많은 당원축적병들의 선별검사 및 치료효과 감시를 위한 보조적인 생물학적 표지자로 보고되어 왔으며, 가성결핍 환자와 당원축적병 환자를 구분하는 유용한 감별진단 요소로 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다[9-12]. Glc₄를 측정하기 위하여 박층크로마토그래피법이나 고성능크로마토그래피법(HPLC)을 비롯한 많은 방법들이 연구되어

Corresponding author: Junghan Song

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 82 Gumi-ro 173beon-gil, Bundang-gu, Seongnam 13620, Korea
Tel: +82-31-787-7691, Fax: +82-31-787-4015, E-mail: songjhpc@snu.ac.kr

Received: March 10, 2015

Revision received: May 21, 2015

Accepted: May 22, 2015

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2015, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

왔다[3, 10, 12, 13]. 최근에는 소변 Glc₄를 측정하는 데 있어 초고성능 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)가 이용되기 시작하였다[14]. 본 연구에서는 HPLC보다 높은 해상도, 짧은 분석시간, 높은 특이도의 장점을 가질 뿐 아니라 GAA 가성결핍 환자를 구분하는 데 도움을 줄 수 있는 것으로 알려진 UPLC-MS/MS를 이용한 소변 포도당 Glc₄의 측정법을 개발하고 평가하였다.

본 연구에서는 분당서울대학교병원에 건강검진 목적으로 방문한 27명의 정상대조군 환자군의 소변 검체와 GAA 유전자검사를 통해 가성결핍 환자로 진단된 3명의 소변 검체, 그리고 GAA 효소 활성측정법과 유전자 돌연변이 검사로 폼페병으로 진단받은 1명 환자의 진단 당시의 소변 검체 및 효소대체치료를 받은 후의 검체

를 이용하였다. 가성결핍 환자와 폼페병 환자의 아카보스 처리한 GAA 효소활성도는 각각 5.8 ± 2.8 와 0.3 nmol/hr/mg protein이었다(정상범위 4.1-60.4 nmol/hr/mg protein).

모든 과정은 원내 임상시험심의위원회의 승인에 의해 진행되었다(No. B-0807/059-301).

Glc₄의 분석은 Sluiter 등[14]의 방법을 변형하여 시행하였다. 보정물질은 Glc₄를 4 mmol/L 요산을 함유한 0.1% 수산화암모늄으로 희석하여 만들었고 0, 5, 25, 50, 100, 250, 500 µmol/L 7가지 단계의 농도로 제조하여 사용하였다. 소변 검체 또는 보정물질 100 µL와 0.1% 수산화암모늄 100 µL를 Amicon Ultra Centrifugal Filters (Ultracel_10K, Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)에 넣고 내부표준물질로 250 mmol/L 아카보스(acarbose) 100 µL를 첨

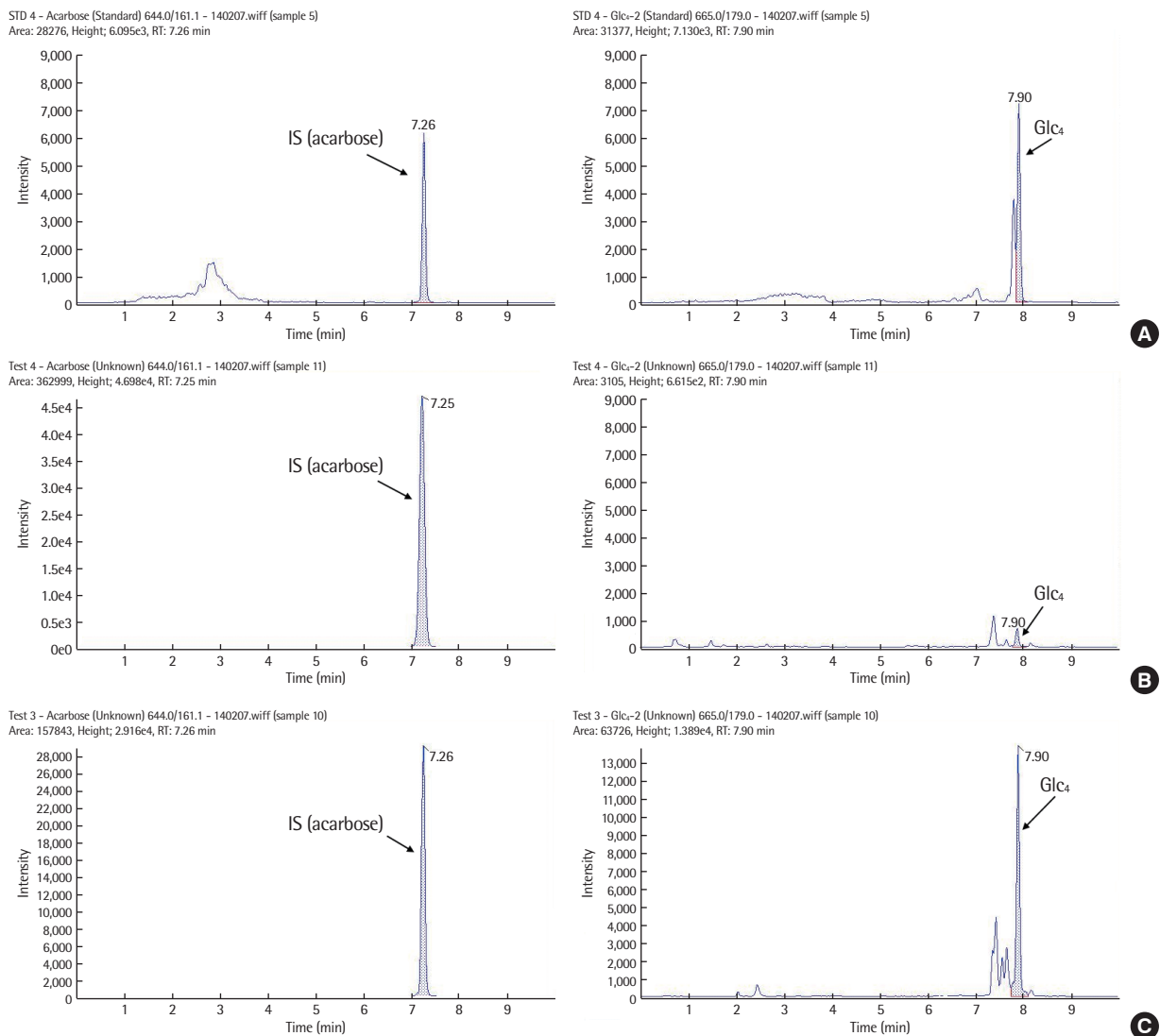


Fig. 1. Representative UPLC-MS/MS MRM chromatograms of 100 µmol/L standard solution of Glc₄ (A) and Glc₄ in urine samples from a normal control (B) and a patient with Pompe disease (C).

가하였다. 13,000 g에서 10분 동안 원심분리한 후 여과액을 UPLC-MS/MS로 분석하였다. UPLC-MS/MS 장비는 LC-30A Nexera UPLC system (SHIMADZU Co., Kyoto, Japan)과 AB SCIEX API 6500 triple quadrupole tandem mass spectrometer (AB Sciex Pte., Ltd., Framingham, MA, USA)를 이용하였고, 칼럼은 ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters, Watford, UK)를 사용하였다. 이동상 A는 90% 아세트니트릴과 0.1% 수산화암모늄을, 이동상 B는 30% 아세트니트릴과 0.1% 수산화암모늄을 사용하였다. 이동상 A를 100%로 시작하여 4분까지 83.3%, 7분까지 50%로 낮춘 후 8분까지 유지하다가, 8.01분에 100%로 높여 칼럼을 재평형화시켰다. Glc₄와 아카보스의 정량은 음이온 모드에서 다중반응모니터링(multiple reaction monitoring, MRM)법으로 이온쌍 m/z 665>179와 644>161을 각각 사용하여 측정하였다. MS/MS 조건은 declustering potential (DP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP)이 각각 -95 V, -44 V, -7 V와 -115 V, -38 V, -15 V였다.

Glc₄와 아카보스의 UPLC 머무름 시간은 각각 7.90분과 7.26분으로 성공적으로 분리되었다(Fig 1). 보정곡선은 5-500 μmol/L 범위에서 직선성을 가지고 있었으며, 선형회귀값(R²)은 0.999 이상이었다. 저농도(10 μmol/L Glc₄)와 고농도(200 μmol/L Glc₄) 물질을 각각 10번 반복 측정하여 구한 일내정밀도의 변이계수는 각각 14.6%와 6.52%였고, 8일 반복 측정하여 구한 일간정밀도의 변이계수는 각각 13.2%와 11.5%를 보여 만족할 만한 수준이었다. Post-column infusion 모델방법으로 측정한 결과 Glc₄의 머무름 시간인 7.90분에서 이온억제가 관찰되지 않았다. 저농도(50 μmol/L)와 고농도(150 μmol/L)의 Glc₄ 표준 물질을 Amicon 필터로 추출하기 전과 후로 2회 측정한 결과, 저농도에서는 120.8±20.8%, 고농도에서는 106.2±5.6%의 회수율을 보여 필터 추출 과정에서의 회수율에

는 문제가 없음을 확인하였다.

27명의 성인 정상대조군의 소변 Glc₄ 농도 분포는 평균과 표준편차가 1.5±1.9 mmol/mol 크레아티닌(mmol/mol Cr)으로, Sluiter 등의 20세 이상 성인의 농도(1.0±1.9 mmol/mol Cr, n=23)와 유사한 분포를 보였다. 3명의 가성결핍 환자들(나이: 28±19세, 모두 남자)의 평균과 표준편차는 12.1±5.4 mmol/mol Cr이었다. 폼페병으로 진단된 6세 여아 환자의 소변 Glc₄값은 171.3 mmol/mol Cr이었으며 효소대체치료를 15개월 시행한 이후 130.9 mmol/mol Cr로 감소하였다(Fig. 2).

이번 연구에서 가성결핍 환자 및 폼페병 환자에서 측정된 Glc₄값은 뚜렷이 구분이 가능했으나, 연구에 활용된 가성결핍 환자 및 폼페병으로 진단받은 환자에서 얻은 검체의 수가 적어 가성결핍 환자의 진단적 구분 및 효소대체치료법의 효과를 추적 관찰하는 데 있어 Glc₄의 유용성의 평가를 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 소변 Glc₄의 농도는 폼페병의 발병 시기와 임상 증상의 진행 속도에 따라 증가 정도가 다를 수 있고[3] 정상인에서도 연령에 따라 정상치의 차이가 있을 수 있으므로[14], 발병 시기 및 중증도에 따른 폼페병 환자군과 다양한 연령의 대조군을 확보한 후 Glc₄ 농도 분포에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서 UPLC-MS/MS를 활용한 소변 Glc₄ 측정법은, 폼페병과 GAA의 가성결핍 환자군에서 Glc₄ 농도의 뚜렷한 차이를 보여, 폼페병의 확진 검사를 위한 보조적인 생물학적 표지자로 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 초고성능 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(UPLC-MS/MS) 이용한 소변 포도당 사당류(Glc₄) 측정법에 대해 평가하였다. 직선성 평가에서 5-500 μmol/L의 범위에서 직선성을 보였고, 일내정밀도와 일간정밀도 변이계수는 각각 6.52-14.6%, 11.5-13.2%를 보였다. 27명의 정상대조군 및 3명의 가성결핍 환자들의 Glc₄ 평균값은 각각 1.5, 12.1 mmol/mol 크레아티닌이었다. 폼페병 환자의 진단 당시 Glc₄ 측정값은 171.3 mmol/mol 크레아티닌이었으며 효소대체치료를 받은 후에 130.9 mmol/mol 크레아티닌으로 감소하였다. 따라서 UPLC MS/MS를 이용한 소변 Glc₄ 측정은 폼페병의 진단에 보조적인 생물학적 표지자로 활용될 수 있을 것이다.

검사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A120030).

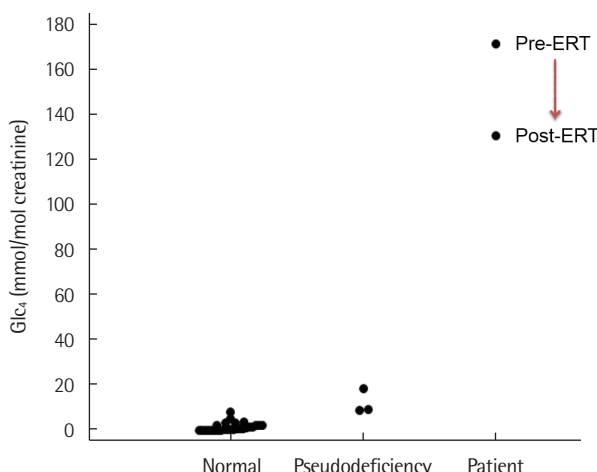


Fig. 2. Urinary Glc₄ concentrations in normal controls (n=27), pseudo-deficiency individuals (n=3), and in a patient with Pompe disease, before and after enzyme replacement therapy (ERT).

REFERENCES

1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet* 2008;372:1342-53.
2. Cho A, Jeong GU, Lim BC, Park JY, Moon JH, Chae JH, et al. Clinical characteristics of childhood Pompe disease. *J Korean Child Neurol Soc* 2007;15:83-9.
3. Manwaring V, Prunty H, Bainbridge K, Burke D, Finnegan N, Franses R, et al. Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glyco-gen storage diseases. *J Inherit Metab Dis* 2012;35:311-6.
4. Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab* 2008;93:275-81.
5. Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, et al. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe dis-ease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab* 2010;99:379-83.
6. Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, et al. Newborn screening for Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab* 2011;104:560-5.
7. Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, et al. High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol Genet Metab* 2009;97:190-5.
8. Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, Hsu LW, Chien YH. Algorithm for Pompe disease newborn screening: results from the Taiwan screening program. *Mol Genet Meta* 2012;106:281-6.
9. Young SP, Stevens RD, An Y, Chen YT, Millington DS. Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316:175-80.
10. Young SP, Piraud M, Goldstein JL, Zhang H, Rehder C, Laforet P, et al. Assessing disease severity in Pompe disease: the roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012;160C:50-8.
11. Lennartson G, Lundblad A, Sjöblad S, Svensson S, Ockerman PA. Quantitation of a urinary tetrasaccharide by gas chromatography and mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1976;3:51-4.
12. An Y, Young SP, Kishnani PS, Millington DS, Amalfitano A, Corz D, et al. Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the thera-peutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2005;85:247-54.
13. An Y, Young SP, Hillman SL, Van Hove JL, Chen YT, Millington DS. Liquid chromatographic assay for a glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease. *Anal Biochem* 2000; 287:136-43.
14. Sluiter W, van den Bosch JC, Goudriaan DA, van Gelder CM, de Vries JM, Huijmans JG, et al. Rapid ultraperformance liquid chromatogra-phy-tandem mass spectrometry assay for a characteristic glycogen-derived tetrasaccharide in Pompe disease and other glycogen storage diseases. *Clin Chem* 2012;58:1139-47.