

파브리병의 신속한 진단을 위한 소변 중 Globotriaosylsphingosine의 UPLC-ESI-MS/MS 분석법

윤 혜 란[#]

덕성여자대학교 약학대학 생의약분석실

(Received December 11, 2015; Revised February 22, 2016; Accepted February 22, 2016)

Quantification of Globotriaosylsphingosine in Urine using UPLC-ESI-MS/MS; Application for Screening Fabry Disease

Hye-Ran Yoon[#]

Biomedical & Pharmaceutical Analysis Lab., College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Globotriaosylsphingosine (lyso Gb3) is considered as one of the biomarkers for Fabry disease. A rapid and simple UPLC-MS/MS method was developed for the determination of reliable biomarker, lyso Gb3. Total analytical procedure takes only 15 min including sample preparation and MS/MS analysis. Limit of detection was 0.85 ng/ml (S/N=3). The calibration curve was linear over the range of 2.0~400.0 ng/ml ($R^2=0.9999$). Inter-day and intra-day assay accuracy were 93.4~100.6% (RSD, 0.6~6.0%) and 97.5~100.7% (RSD, 3.6~5.2%). Absolute recoveries of 97.6~98.6 showed excellence of a new analytical method. The method was applied to human and mice urines, proved the suitability for the quantification of lyso-Gb3 for screening, diagnosis and therapeutic monitoring of Fabry disease patients.

Keywords □ Fabry disease, Lyso-Gb3, MS/MS, inherited disease

파브리병(OMIM 301500)은 X-염색체 연관 유전질환으로 리소좀에 있는 α -galactosidase A(α -Gal A)의 결핍으로 globotriaosylceramide나 globotriaosylsphingosine(lyso-Gb3)이 체내에서 분해되지 못하고 특히 신장, 심장, 눈과 체액 등에 축적되는 질환이다. 부족한 효소는 결과적으로 신장, 심장, 눈과 체액 내로 중성형의 glycosphingolipids인 globotriaosylceramide(Gb3)나 lyso-Gb3가 축적된다.^{1,2)} 주요 의학적 증상으로는 초기에 만성통증, 위장 장애, 혈관각화증, 무한증, 말단지각이상증이 나타나다가 그 이후에는 심근증, 뇌혈관질환 그리고 신부전 등의 증상이 나타난다.¹⁾ 의학적 증상과 질환의 정도는 대략적으로 잔여 α -Gal A의 효소 활성과 연관된다.¹⁾ 증상이 나타나는 이형접합체의 진단

은 분자학적 분석이나 α -Gal A의 효소활성검사에 의해 쉽게 얻을 수 있으나, 효소적 진단에서의 α -Gal A 검사상 정상범위 이하로 나타나는 파브리병의 이형접합체 환자의 상당수는 임상상 믿을 수 없다.²⁾ 치료를 위해서는 초기단계에서의 효소대체요법이 최상의 효과를 보이므로 적절한 검사와 진단이 개시되어야 한다.

몇 년 전까지만 해도 혈장 또는 소변의 일반적인 Gb3 수치가 파브리병의 생체지표로 큰 주목을 받았다.³⁻⁵⁾ 최근 점차로 파브리병 진단에서 파브리병 환자의 소변에서의 lyso-Gb3 배설이 주목을 받고 있으며 이와 상당히 관련이 있는 의학관련 논문들이 출판되었다.^{6,7,9-11)} 전통적으로 lyso-Gb3의 분석방법은 HPLC와 형광검출기에 의한 lysoglycolipid 내에 존재하는 아민의 오르소-프탈알데히드 유도체화에 기본을 두고 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

LC-MS/MS는 그 자체로 고감도, 특수성, 분석의 속도와 같은 자체 강점을 가지므로 분석의 전형적인 사례로 lyso-Gb3을 포함한 LC-MS/MS의 사용이 점점 더 늘어나고 있다.^{9,15-19)} 본 연구는 UPLC-ESI-MS/MS를 이용한 사람의 소변 안에 lyso-Gb3의 정량화를 빠르고 간단한 분석방법을 개발하고자 하였다.

[#]Corresponding Author

Hye-Ran Yoon

Biomedical & Pharmaceutical Analysis Lab., College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Tel.: 02-901-8387 Fax.: 02-901-8164

E-mail: hyeran11@ds.ac.kr

실험 방법

시약 및 기기

Lyso-Gb3와 N,N-Dimethyl-D-erythro-sphingosine(내부표준액) Matreya(PA, USA)로부터 얻었다. J. T. Baker 혹은 YAKURI pure chemical Co. LTD(Osaka, Japan)로부터 기타 모든 시약과 유기 용매, dimethylsulfoxide(DMSO)와 acetonitrile(ACN)의 분석용 시약을 구입하였다. 증류수는 Millipore-Milli Q™를 통해 준비가 되었다. 증발에는 TAITEC model DTU-2C Thermo vap(Tokyo, Japan)을 사용하였다.

표준용액 조제

모든 lyso Gb3 표준용액(1 mg/ml of lyso-Gb3)과 내부 표준용액은(5 mg/ml)은 다이메틸설폭시화물(dimethylsulfoxide)로 용해시켜 -20°C에서 저장했으며 최소한 6개월은 안정적으로 유지 가능하다. 표준용액(100 ng/ml)은 필요할 때마다 50% 아세토니트릴을 첨가하여 연속 희석법으로 준비하였다.

UPLC-MS/MS 조건

Electrospray ionization(ESI)-MS/MS는 Biosystem API 4000 MS/MS(CA, USA)을 적용하였으며 Shiseido corporation UPLC system(Tokyo, Japan)과 함께 사용하였다. LC 시스템은 LC-3133 Nonspace autosampler 모델과 3101 binary pump로 구성되어 있다. 양이온 모드를 이용하였으며 Multiple reaction monitoring(MRM)기법을 이용하여 MS/MS(declustering potential 126 V, collision energy 49 V, collision exit potential 16 V, and the entrance potential 10 V)를 이용하여 정량하였다. 사용한 칼럼으로는 Phenomenex Kinetex-C18(2.1×50 mm, 2.6 μm)를 이용하였으며 이를 통하여 크로마토그래피상의 분리를 수행하였다. 이동상 A는 5% 아세토니트릴에 0.1% formic acid(FA)를 섞었으며, 이동상 B는 100% 아세토니트릴에 0.1% formic acid(FA)를 섞어 구성하였으며 300 μl/min의 유속으로 흘려보냈다. 용매의 농도 구배 용리는 20% solvent B에서 90% solvent B까지를 이용하였다. 탠덤매스와 LC 시스템의 Autosampler는 4°C로 유지하였고 주입량은 10 μl로 주입하였다.

검체와 검체 채취

정상인 30명과 파브리병 환자 30명의 소변(남자15명, 여자15명)을 서울 의과학연구소(Seoul, Korea)로부터 얻었다. 모든 검체는 분석 전까지 -20°C에서 보관되었다. 소변 검체(100 μl)에 아세토니트릴을 가하여 단백질을 침전시켜 제거하였다. 제단백한 소변 검체에 표준용액 200 μl와 내부표준액(100 ng/ml) 10 μl을 첨가하였다. 이 용액에 아세토니트릴(690 μl)을 용매로 첨가하여 1분 동안 vortex로 잘 섞었다. 이 액을 12,000 g로 5분 동

안 원심분리 후, 그 상등액을 0.2-μm filter(Whatman, NJ, USA)로 여과한 후 LC-MS/MS 시스템으로 10 μl 주입하였다.

직선성과 감도

정량을 위해 검량선용으로 합동소변(정상인 30명의 소변) 100 μl에 여러 가지 농도의 lyso Gb3 표준물질(0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5과 25 ng/ml)을 첨가하였다. x축과 y축에 각각 표준물질의 농도와 내부표준 물질의 각 농도의 피크 면적에 대한 표준물질 농도의 피크 면적의 비의 수치를 적용하여 검량선을 작성하였다.

검출한계(LOD)는 S/N=3으로 계산하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10으로 계산하였다.²⁰⁾ 검출한계, 즉 가장 낮은 농도에서 lyso-Gb3를 정량한 값은 정확도(<20%)와 정밀성(<20% CV)이 허용범위 내에서 정량될 수 있음이 확인되었다. 또한 정량한계는 검량선의 범위 중 가장 낮은 농도를 포함하고 있었다.²⁰⁾

밸리데이션; 정확도, 정밀도 및 회수율

방법의 밸리데이션은 미국 FDA(the United States Food and Drug Administration)의 생체시료 검증 레퍼런스를 가이드로하여 수행하였다.²⁰⁾ 정확성은 역으로 산출한 농도값을 명목 기준 농도의 비율로 계산하였고(측정된 농도/명목측정 농도×100%). 정밀성은 일내 검증(n=3), 과 일간 검증(n=9) 기간 동안의 반복 검증으로부터 나온 피크 면적에 따라 얻어진 농도의 % CV로 계산하였다.²¹⁾

회수율은 고농도 중농도 저농도에서 추출과정을 거친 표준물질 농도와 추출과정을 거치지 않은 표준물질의 농도를 계산함으로써 결정하였다. 분석상에서의 불순물의 잔류정도는 고농도의 lyso-Gb3 측정 후에 6개의 공시료 검체를 측정하여 평가했다(테이터는 본 논문에 넣지 않았음).

결과 및 고찰

본 연구에서 단백질 침전 효율성을 다양한 용매(헥산, 디에틸 에테르, 아세토니트릴, 디클로로메탄)에 대하여 비교하여 본 결과 아세토니트릴은 가장 효율적인 용매였다. 액체-액체-추출이나 고체-액체 추출법보다 아세토니트릴만을 이용한 제단백 및 추출은 가장 경제적이고 실험속도가 빠른 장점이 있다. 시료 전처리 및 추출과정으로 단백질 제거 후 그 상등액을 취하여 여과한 후 UPLC-MS/MS system으로 주입하였다.

질량분석 스펙트라의 기준피크([M+H])는 m/z=786.6이었고, 조각이온으로는 m/z=282.4, m/z=264.4, m/z=96과 m/z=84의 이온을 얻었다.

표준품의 lyso-Gb3를 첨가하여 정량한계 근처의 농도를 검토하였을 때 lyso-Gb3 피크는 정량하는데 문제없이 명확히 보여

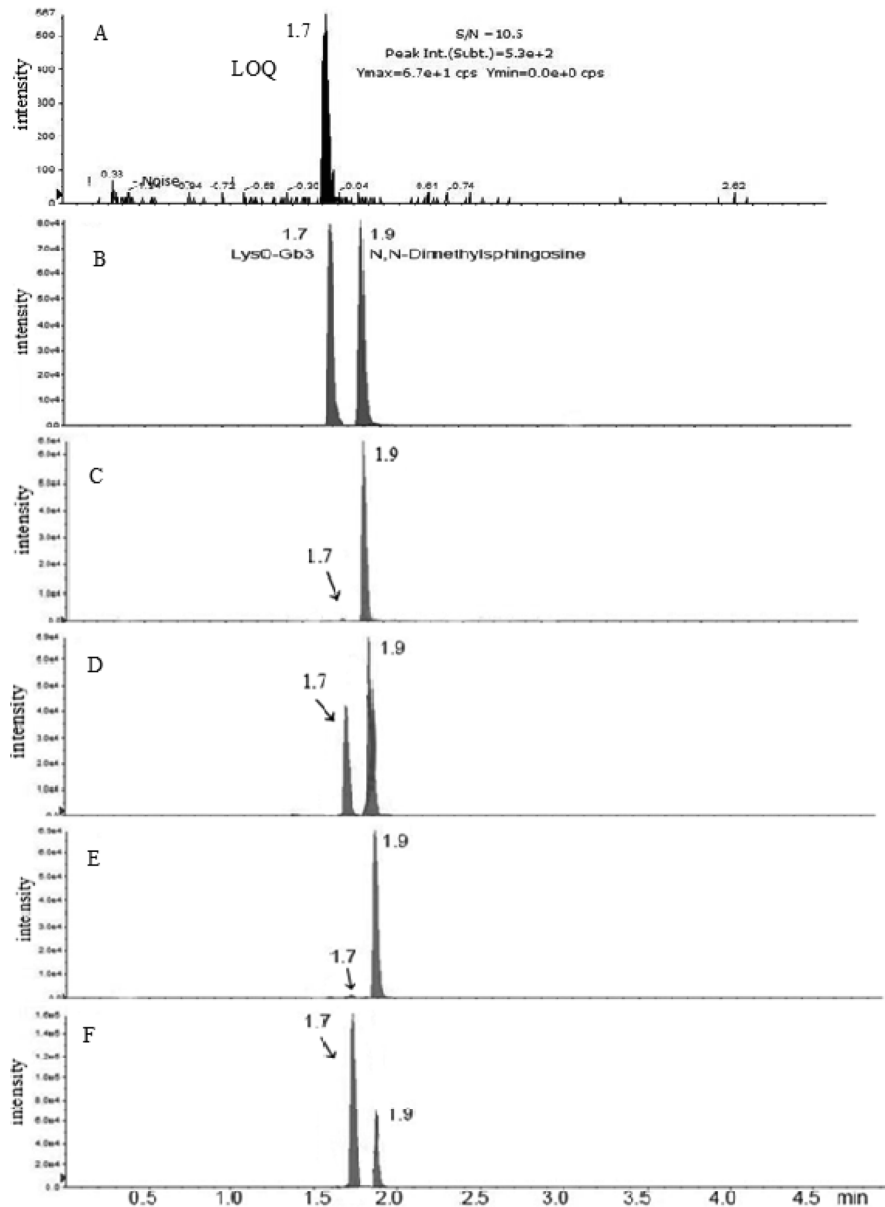


Fig. 1 – UPLC-MS/MS chromatograms; (A) at the LOQ concentration, (B) lyso-Gb3 standard and internal standard, (C) control urine, (D) urine with Fabry disease patient.

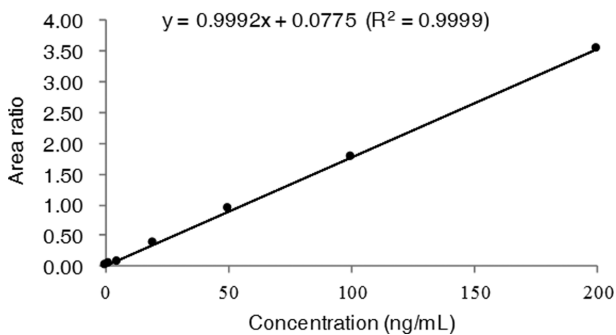


Fig. 2 – Calibration curve of lyso-Gb3 standard solution spiked to urine.

질 수 있음이 확인되었다(Fig. 1A). 표준품 lyso-Gb3(1.7분)와 내부표준액(1.9분)의 크로마토그램은 2분 이내로 나타났다(Fig. 1B).

검량선은 측정 농도범위 2~200 ng/mL에서 $R^2=0.9999$ ($y=0.9992x+0.0775$)로서 양호한 직선성을 보였다(Fig. 2). 본 연구에서 간편 신속한 시료 전처리와 UPLC-MS/MS를 이용한 lyso Gb3 분석 방법은 시료 준비에서부터 크로마토그래프를 이용한 정량분석까지 15분 밖에 걸리지 않는다.

본 연구에서 개발된 방법을 통해 얻은 검출한계인 1.27 nmol/l (~1 ng/mL, S/N=3.5)는 Togawa 등의 결과보다 양호하였으므로

Table I – Precision, accuracy and recovery of the intra- and inter-day assay

Conc. (ng/ml)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=9)			Recoveries (n=9) (%)
	Mean Conc.±SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)	Mean Conc.±SD	Precision RSD (%)	Accuracy (%)	
4	3.7±0.1	3.0	93.4	3.9±0.2	5.2	97.5	97.6
50	50.3±3.0	6.0	100.6	50.4±2.2	4.4	100.7	98.4
100	99.6±0.6	0.6	99.6	99.7±3.6	3.6	100.4	98.6

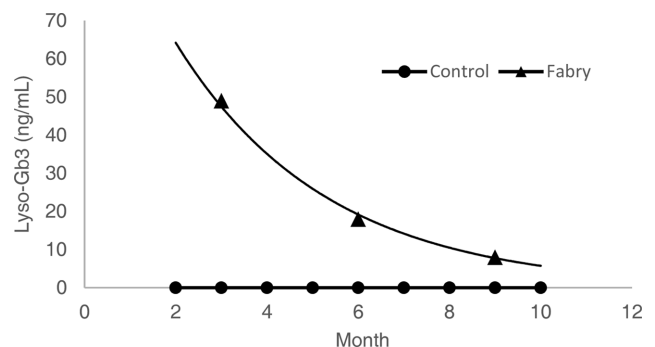
본 방법의 우수성이 입증되었다.¹⁰⁾ 파브리병 환자 중 효소의 활성도가 매우 낮은 수치를 보이는 74명의 환자의 소변 중에서 측정된 lyso-Gb3의 분비량을 살펴보았다. 효소 활동도가 20% 이하로 낮은 경우 lyso-Gb3 농도는 14 µg/l 이상이었고, 효소 활동도가 10% 이하로 낮은 경우 lyso-Gb3 농도는 22 µg/l 이상이였다.

본 연구는 FDA 밸리데이션 가이드 라인에 따라 검증하였을 때 RSD±15% 내에서 정밀성과 정확성이 잘 유지되었다.²⁰⁾ 정확성과 정밀성은 일내, 일간 동안의 반복검증으로 소변의 lyso-Gb3의 농도를 측정하여 검토하였다. 저농도, 중간농도, 고농도에서의 일내 정확성과 정밀성은 93.4~100.6%(RSD, 0.6~6.0%)로 매우 양호하였다. 저농도, 중간농도, 고농도에서의 일간 정확성과 정밀성은 97.5~100.7%(RSD, 3.6~5.2%)로 측정되었다 (Table I). 추출 후 lyso Gb3의 평균 회수율은(n=3) 97.6~98.6%이었다. 일반적으로 스크리닝 목적으로 검사할 경우, 회수율의 허용 범위는 60% 이상으로 보고되고 있다. 따라서 새로이 개발된 본 분석 방법의 회수율은 스크리닝 및 진단 목적을 위한 검사에 사용하기에 충분한 허용범위 내에 속하였다.

개발된 UPLC-MS/MS 방법을 정상인의 소변과 파브리병 환자의 소변에 적용하였다. Fig. 1A는 정량한계 근처에서의 lyso-Gb3의 UPLC-MS/MS 크로마토그램이고, Fig. 1B는 lyso-Gb3 표준물질과 내부표준물질의 크로마토그램이며, Fig. 1C는, 파브리병의 정상인 대조군의 것을 Fig. 1D는 파브리병 환자의 소변의 크로마토그램을 보여준다. 예측되는 바와 같이 정상인 대조군의 소변보다 파브리병 환자의 소변에서 lyso-Gb3의 농도가 매우 높게 배출되고 있다(Fig. 1C and D).

정상인 대조군 30명의 소변을 측정했을 때, 한국인의 lyso-Gb3 정상범위는 0.19~1.97 ng/ml⁹⁾이었고 반면에 파브리 환자는(n=3) 12.90~49.40 ng/ml로 측정되었다. Togawa 등은 파브리병 환자의 소변 중 lyso-Gb3 평균농도는 고전적 파브리병인 동형접합체에서 134±44 nmol/l, 파브리 반접합체에서 42±23 nmol/l, 파브리 이형접합체 안에서 18±9 nmol/l라고 보고하였다.¹⁰⁾

효소치환 치료후의 치료 약물 모니터링의 측과 이의 lyso-Gb3와의 의학적 연관성을 보기 위해 파브리 환자 한 명의 소변수치를 9개월 동안 매 3개월마다 측정하였다. Lyso-Gb3의 수치는 50 ng/ml에서 8 ng/ml으로 극적으로 감소되었으며 효소치환 9개월 치료 후 거의 대부분 정상인의 수치와 비슷한 정도로 감소되었

**Fig. 3** – Monitoring of lyso-Gb3 level in urine with Fabry disease after enzyme therapy.

음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과는 lyso-Gb3 level과 임상적 증상과 매우 연관성이 있음을 보여주고 있다.

최근의 잇단 연구들은 Gb3보다 lyso-Gb3 수치가 파브리 환자의 임상적증상과 더 연관성이 있다고 관측한다.²³⁾ Gb3의 탈아실화된 Gb3 형태인 globotriaosylsphingosine(lyso-Gb3)는 파브리병 환자의 혈장과 소변에 고농도로 발견되며 lyso-Gb3는 진단과 파브리병 관찰의 잠재적 바이오 마커가 될 수 있다.^{9,10,18)} 지금까지는 효소치환 치료가 파브리병의 이용 가능한 유일한 치료법이었으나, 파브리병 치료의 새로운 시도는 계속되고 있으며 사폐론을 이용한 치료도 검토 중이며 일부 효과가 있음이 보고되고 있다.²⁴⁻²⁷⁾ 파브리병 환자의 삶의 질을 고려할 때 가능한 한 신속하게 파브리병을 진단하여야 함은 말할 필요도 없다.

본 연구에서는 UPLC-MS/MS를 이용한 빠르고 간단한 파브리병 진단의 가능성을 입증하였다. 본 연구의 장점은 신속한 시료전처리로서 유기용매로 제단백 과정만 거친 후 UPLC-ESI-MS/MS로 소변 중 lyso Gb3를 이용하여 분석하였다.

결론

저자는 고가이면서 많은 전처리 시간이 요구되는 고체상 추출 단계 없이도 빠르고 간단하면서도 고감도의 분석방법인 UPLC-MS/MS를 이용한 lyso-Gb3의 분석법을 개발하였다. 본 연구는 밸리데이션을 통한 방법의 유용성 및 인체 소변시료에 적용함으로써 임상적 응용성도 입증되었다. 따라서 본 연구는 파브리병의 유용한 진단과 치료 관찰의 도구가 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 서울 의과학 연구소의 이경률 박사과 이향자 연구원, 울산 의과대학 서울아산 병원의 유한욱 박사과 김구환 박사, 그리고 덕성여대 정현수 연구원의 도움을 받았으므로 이에 감사드립니다.

References

- 1) Scriver, C. R., Sly, W. A., Beaudet, A. L. and Valle, D. : *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, ed.. McGraw Hill, New York (2001).
- 2) Wilcox, W. R., Oliveira, J. P., Hopkin, R. J., Ortiz, A., Banikazemi, M., Rasmussen, U. F., Sims, K., Waldek, S., Pastores, G. M., Lee, P., Eng, C. M., Marodi, S., Standford, K. E., Breunig, F., Wanner, C., Warnock, D. G., Lemay, R. M. and Germain, D. P. : Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol. Genet. Metab.* **93**, 112 (2008).
- 3) Whitfield, D. P., Calvin, J., Hogg, S., O'Driscoll, E., Halsall, D., Burling, K., Maguire, G., Wright, N., Cox, T. M., Meikle, P. J. and Deegan, P. B. : Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease--role of urine globotriaosylceramide. *J. Inher. Metab. Dis.* **28**, 21 (2005).
- 4) Kitagawa, T., Ishige, N., Suzuki, K., Owada, M., Ohashi, T., Kobayashi, M., Eto, Y., Tanaka, A., Mills, K., Winchester, B. and Keutzer, J. : Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* **85**, 196 (2005).
- 5) Rozenfeld, P. A., De Francesco, N. P., Borrajo, G. J., Ceci, R. and Fossati, C. A. : An easy and sensitive method for determination of globotriaosylceramide (Gb3) from urinary sediment: utility for Fabry disease diagnosis and treatment monitoring. *Clin. Chim. Acta.* **403**, 194 (2009).
- 6) Rombach, S. M., Dekker, N., Bouwman, M. G., Linthorst, G. E., Zwinderman, A. H., Wijburg, F. A., Kuiper, S., vd Bergh Weerman, M. A., Groener, J. E. M., Poorthuis, B. J., Hollak, C. E. M. and Aerts, J. M. : Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1802**, 741 (2010).
- 7) Scheidt, W. V., Eng, C. M., Fitzmaurice, T. F., Erdmann, E., Hubner, G., Olsen, E. G., Christomanou, H., Kandolf, R. and Esnick, R. J. : An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N. Engl. J. Med.* **324**, 395 (1991).
- 8) Kusano, E., Saito, O., Akimoto, T. and Asano, Y. : Fabry disease: experience of screening dialysis patients for Fabry disease. *Clin. Exp. Nephro.* **18**, 273 (2014).
- 9) Gold, H., Mirzaian, M., Dekker, N., Ferraz, M. J., Lugtenburg, J., Codee, J. D., Marel, G. A., Overkleeft, H. S., Linthorst, G. E., Groener, J. E., Aerts, J. M. and Poorthuis, B. J. : Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* **59**, 547 (2013).
- 10) Togawa, T., Kodama, T., Suzuki, T., Sugarawa, K., Tsukimura, T., Ohashi, T., Ishige, N. and Suzuki, K. : Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* **100**, 257 (2010).
- 11) Aerts, J. M., Groener, J. E., Kuiper, Doncker-Koopman, W. E., Strijland, A., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F. A., Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Rombach, S. M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Bootr, G., Hollak, C. E., Brady, R. O. and Poorthuis, B. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 2812 (2008).
- 12) Clarke, J. T. : Narrative review: Fabry disease. *Ann. Intern. Med.* **146**, 425 (2007).
- 13) Lavoie, P., Boutin, M. and Auray-Blais, C. : Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb3-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 1743 (2013).
- 14) Young-Gqamana, B., Brignol, N., Chang, H. H., Khanna, R., Soska, R., Fuller, M., Sitaraman, S. A., Germain, D. P., Giugliani, R., Hughes, D. A., Mehta, A., Nicholls, K., Boudes, P., Lockhart, D. J., Valenzano, K. J. and Benjamin, E. R. : Migalastat HCl reduces globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) in Fabry transgenic mice and in the plasma of Fabry patients. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0057631 Epub (2013).
- 15) Auray-Blais, C., Ntwari, A., Clarke, J. T. R., Warnock, D. G., Paulo Oliveira, J., Young, S. P., Millington, D. S., Bichet, D. G., Sirrs, S., West, M. L., Casey, R., Hwa, W. L., Keutzer, J. M., Zhang, X. K. and Gagnon, R. : How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease?. *Clin. Chim. Acta.* **411**, 1906 (2010).
- 16) Boutin, M. and Auray-Blais, C. : Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb3-related analogues in Fabry disease. *Anal. Chem.* **86**, 3476 (2014).
- 17) Dupont, F. O., Gagnon, R., Boutin, M. and Auray-Blais, C. : A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr. Med. Chem.* **20**, 280 (2013).
- 18) Auray-Blais, C., Blais, C. M., Ramaswami, U., Boutin, M., Germain, D. P., Dyack, S., Bodamer, O., Morell, G. P., Clarke, J. T., Bichet, D. G., Warnock, D. G., Echevarria, L., West, M. L. and Lavoie, P. : Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Acta.* **438**, 195 (2015).
- 19) Johnson, B., Mascher, H., Mascher, D., Legnini, E., Hung,

- C. Y., Dajnoki, A., Chein, Y. H., Marodi, L., Hwa, W. L. and Bodamer, O. A. : Analysis of lyso-globotriaosylsphingosine in dried blood spots. *Ann. Lab. Med.* **33**, 274 (2013).
- 20) Food and drug administration <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf> (2001).
- 21) Causon, R. : Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **689**, 175 (1997).
- 22) Kruger, R., Tholey, A., Jakoby, T., Vogelsberger, R., Monnikes, R., Rossmann, H., Beck, M. and Lacker, K. J. : Quantification of the Fabry marker lysoGb3 in human plasma by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **833**, 128 (2012).
- 23) Young, E., Mills, K., Morris, P., Vellodi, A., Lee, P., Waldek, S. and Winchester, B. : Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta. Paediatr.* **94**, 51 (2005).
- 24) Fan, J. Q. and Ishii, S. : Cell-based screening of active-site specific chaperone for the treatment of Fabry disease. *Methods Enzymol.* **363**, 412 (2003).
- 25) Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N. and Suzuki, Y. : Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **5**, 112 (1999).
- 26) Valenzano, K. J., Khanna, R., Powe, A. C., Boyd, R. and Lee, G. : Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 213 (2011).
- 27) Togawa, T., Kawashima, I., Kodama, T., Tsukimura, T., Suzukia, T., Fukushige, T., Kanekura, T. and Sakuraba, H. : Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **399**, 716 (2010).