

尿ろ紙を用いた先天性ムコ多糖症のスクリーニング：  
マイクロプレート法による検討  
(分担研究： マス・スクリーニング対象疾患に関する研究)

研究協力者 田中あけみ\*

共同研究者 小川浩子\*、中島良一\*\*、一色 玄\*、松本 進\*\*\*、武井節子\*\*\*

見出し語： 尿ろ紙、先天性ムコ多糖症、マイクロプレート

## 要約

先天性ムコ多糖症のスクリーニングの方法を尿ろ紙を用いて検討した。

ろ紙中のムコ多糖は、蒸留水中では抽出されにくく、0.18Mトリスギ酸バッファーpH8.8中でよく抽出された。ろ紙中のムコ多糖の抽出には、煮沸あるいは超音波処理が必要であった。超音波処理は、時間的にも短く、一度に処理できる検体数も多かった。

ムコ多糖は、ジメチルメチレンブルーにて、クレアチニンは、ピクリン酸ナトリウムにてそれぞれマイクロプレート上で反応させ、共に525nmの波長でマイクロプレートリーダーによる定量的測定が可能であった。この方法は、多数の検体を測定するのに優れており、スクリーニングの方法として有用であると考えられた。

クレアチニンの低い検体は、単位クレアチニン当たりでムコ多糖を算出したとき、正常児でも異常高値をとる危険があった。また、ムコ多糖症患者でも、正常域にはいる検体も存在した。他方、ムコ多糖値のみで表わした方が、正常児とムコ多糖症患者との区別が容易であった。

1年前の尿ろ紙検体でもムコ多糖測定値に有為な変動はなく、尿ろ紙は、検体の保存にも輸送にも優れていると考えられた。

---

\* 大阪市立大学医学部小児科 (Department of Pediatrics, Osaka City University School of Medicine)

\*\* 大阪市立総合医療センター小児科 (Department of Pediatrics, Osaka City General Medical Center)

\*\*\* 大阪市環境保健局保健衛生検査所 (Laboratory Center of Mass Screening, Department of Public Health in Osaka City)

## I. 研究方法

[材料] 標準検体は、現在大阪市で施行されている神経芽細胞腫スクリーニング用のろ紙（45 x 45 mm）に、コンドロイチン硫酸A/Cの水溶液を20～300  $\mu$ g/ml の濃度に、適当に段階希釈したものを0.7ml量染み込ませて、乾燥させたものを用いた。測定検体は、神経芽細胞腫スクリーニング検体の検査済みのものを袋より無作為取り出し、個人名を不明にして用いた。検体採取時期は、平成5年8月分300検体、平成5年2月分100検体、平成4年8月分100検体で、測定時期は、平成6年1月であった。測定は、全て上記ろ紙の6 mmパンチ4個を各々1検体として行った。

[溶出法の検討] 溶出液は、蒸留水または、0.18M トリスギ酸バッファーpH8.8を1検体につき0.3ml用いた。方法は、室温に静置、または振とう、煮沸、超音波処理について検討した。煮沸は、標準ろ紙の6 mmパンチ4枚を1.5ml容のスクリュウキャップ付サンプルチューブに入れ、0.3mlの蒸留水または、0.18M トリスギ酸バッファーpH8.8を加えて、30、60、90、120分間について行った。超音波処理は、超音波洗浄器を用いて、上記と同様の検体を60℃温水中で30、60分間行った。

[測定法の検討] ムコ多糖の呈色反応： 96穴平底マイクロプレートに、コンドロイチン硫酸A/Cの標準水溶液または、前述の溶出液を10  $\mu$ l入れ、35  $\mu$ Mジメチルメチレンブルー-0.18M トリスギ酸バッファーpH8.8溶液を240  $\mu$ l加えて発色させた。

クレアチニンの呈色反応： 96穴平底マイクロプレートに、クレアチニンの標準水溶液または、前述の溶出液5  $\mu$ lを入れ、これに1.2%ピクリン酸

ナトリウム水溶液100  $\mu$ lと2.5N-NaOH溶液10  $\mu$ lとを加えて、攪拌し、15分間室温に静置して発色させた。

吸光度の測定： コロナMTP-32マイクロプレートリーダーを用いて、波長525nmで、ムコ多糖の場合は直ちに、クレアチニンの場合は、15分間室温静置後に吸光度を測定した。

[検体の測定] 上記の検討結果より、以下の方法で尿ろ紙検体を測定した。

(1) 直径6mmの尿ろ紙4枚を1.5ml容のスクリュウキャップ付サンプルチューブに入れ、0.3mlの0.18M トリスギ酸バッファーpH8.8を加えて60℃温水中で、60分間超音波処理を行う。(2) ろ紙をピンセットでチューブより取り出し、残った溶出液を10分間遠心し、上清を200  $\mu$ l取って新しいチューブに移す。(3) ムコ多糖は、ろ紙溶出液10  $\mu$ lに35  $\mu$ Mジメチルメチレンブルー-0.18M トリスギ酸バッファーpH8.8溶液240  $\mu$ lを加えて、直ちにマイクロプレートリーダーで波長525nmの吸光度を測定する。(4) クレアチニンは、ろ紙溶出液5  $\mu$ lに1.2%ピクリン酸ナトリウム水溶液100  $\mu$ lと2.5N-NaOH溶液10  $\mu$ lとを加えて攪拌し、15分間室温に静置後、マイクロプレートリーダーで波長525nmの吸光度を測定する。

これらの吸光度測定値よりムコ多糖およびクレアチニン定量値を検量線をもとに算出し、ムコ多糖の値をクレアチニン当たりの量で表わした。

## II. 結果

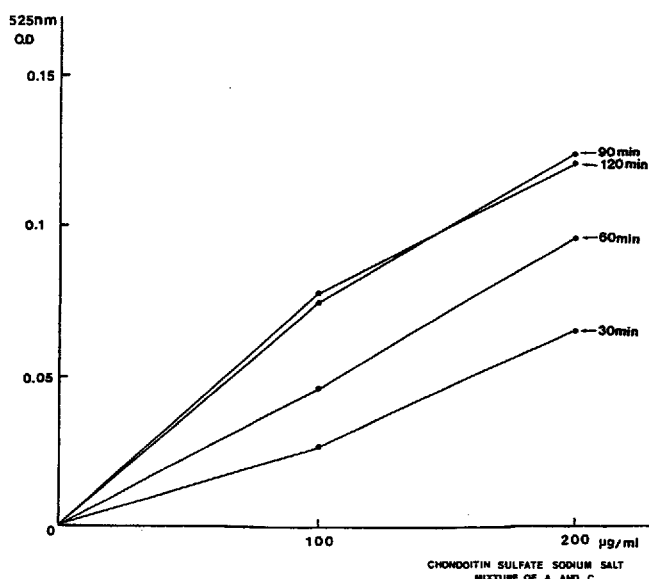
### (1) 抽出法について

室温に静置、または振とうによつては、蒸留水中でも0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8中でも全くムコ多糖は、溶出されなかった。

0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8中で30、60、90、120分間煮沸した結果を図1に示した。溶出量は、90分間の煮沸でほぼプラトーに達した。蒸留水中では、溶出量は、1/5以下に落ちた。

0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8中で60℃で60分間超音波処理を行った場合、90分間の煮沸と同等以上の溶出量が得られた。

60分間の超音波処理を行った場合の、蒸留水と0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8との溶出量の比較を図2に示した。蒸留水中では、0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8中の約2割程度しか溶出されなかった。



(図1) 煮沸によるろ紙からのムコ多糖の溶出。

### (2) 定量性について

図3にこの方法によるムコ多糖の検量線を示した。40 μg/ml以下の濃度では、ほぼ直線性を示し、80 μg/ml以上でプラトーに達した。

図4にクレアチニンの検量線を示した。200mg/dlの濃度まで直線性を示した。

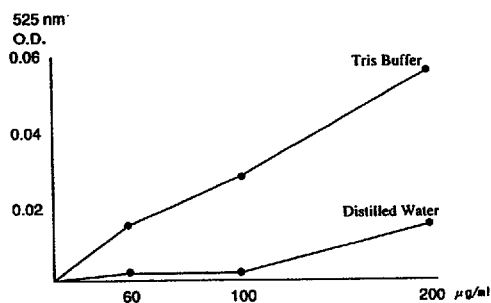
これらより、ムコ多糖もクレアチニンもマイクロプレートによる定量的測定が可能であると判断された。

### (3) 検体の測定値について

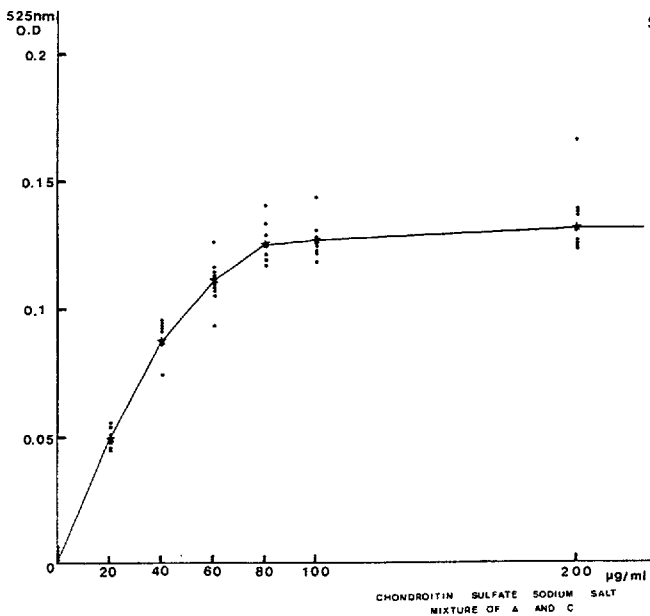
平成5年8月分、平成5年2月分、平成4年8月分の各々の検体間の測定値に、有為の差はなかった。

図5に、単位クレアチニン当たりで表わしたムコ多糖測定値のヒストグラムを示した。クレアチニン値の低い検体では高値をとるため、幅広い分布を示し、ムコ多糖症患者との区別が困難であった。

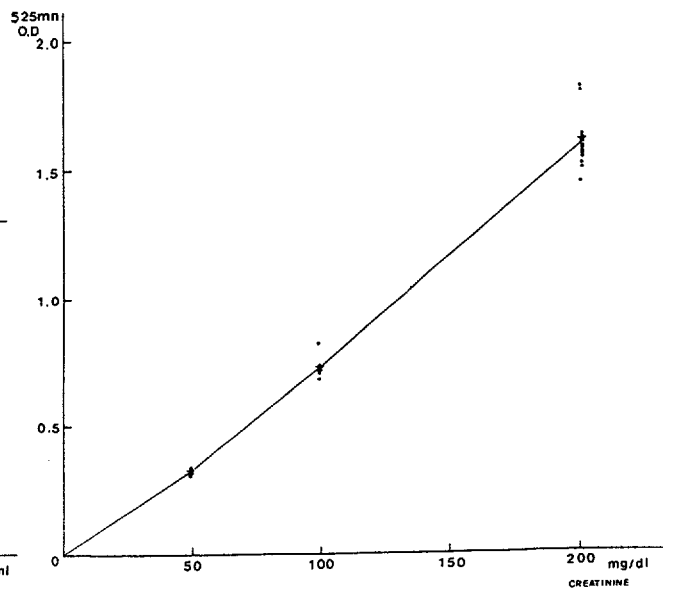
図6にムコ多糖測定値のみによるヒストグラムを示した。図に見られるように、92%の検体が40 μg/ml未満の値を示し、ムコ多糖症患者との区別がより容易であった。



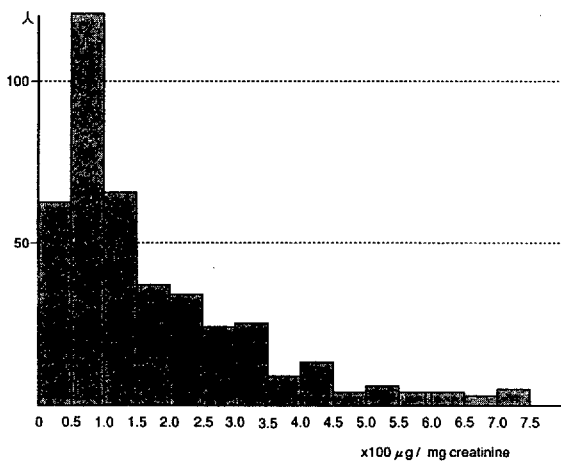
(図2) 超音波処理によるろ紙からのムコ多糖の溶出。  
蒸留水と0.18Mトリスギ酸バッファ-pH8.8の溶出液の比較。



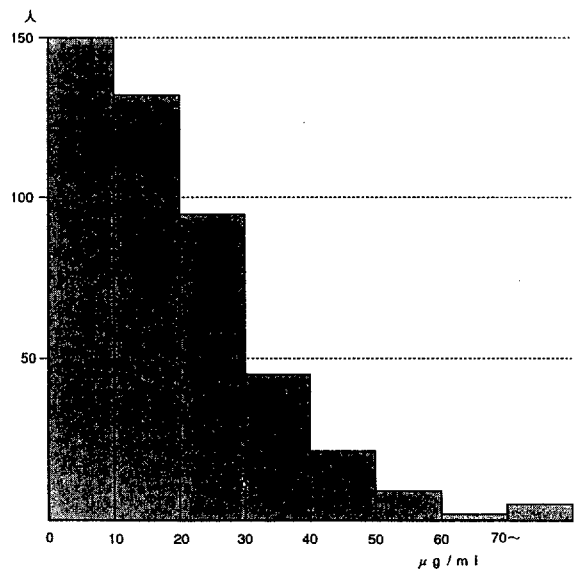
(図3) マイクロプレート法によるムコ多糖の定量



(図4) マイクロプレート法によるクレアチニンの定量



(図5) 単位クレアチニン当りで表したムコ多糖測定値の分布



(図6) 溶出液中のムコ多糖量の測定値の分布

### III. 考察

ろ紙中のムコ多糖は、蒸留水中では抽出されにくく、0.18M トリスギ酸バッファー pH 8.8 中でよく溶出された。ムコ多糖は、弱アルカリ性においてよく溶出されると推測された。

ろ紙中のムコ多糖は、文献(1)で報告されたような蒸留水に浸すだけの方法では溶出されず、煮沸

あるいは超音波処理が必要であった。煮沸による方法は、途中で水を足すなどの操作が必要であったため、超音波処理の方がより容易であった。また、時間的にも短く一度に処理できる検体数も多かった。

ムコ多糖は、ジメチルメチレンブルーにて、クレアチニンは、ピクリン酸ナトリウムにてそれぞれマイクロプレート上で反応させ、共に 525nm の

波長でマイクロプレートリーダーによる定量的測定が可能であった。この方法は、多数の検体を測定するのに優れており、スクリーニングの方法として有用であると考えられた。

クレアチニンの低い検体は、単位クレアチニン当たりでムコ多糖を算出したとき、正常児でも異常高値をとる危険があった。また、ムコ多糖症患者でも、正常域にはいる検体も存在した。他方、ムコ多糖値のみで表わした方が、正常児とムコ多糖症患者との区別が容易であった。

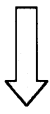
1年前の尿ろ紙検体でもムコ多糖測定値に有為な変動はなく、尿ろ紙は、検体の保存にも輸送にも優れていると考えられた。

#### IV. 文献

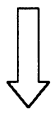
(1) Whitley, C.B., Draper, K.A., Dutton, C.M., Brown, P.A., Severson, S.L., France, L.A. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix. Clin. Chem. 35: 2074-2081, 1989.

(2) 折居忠夫、ムコ多糖症のマス・スクリーニング。第21回日本マス・スクリーニング学会、1993年





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 要約

先天性ムコ多糖症のスクリーニングの方法を尿ろ紙を用いて検討した。

ろ紙中のムコ多糖は、蒸留水中では抽出されにくく、0.18M トリスギ酸バッファー pH8.8 中でよく抽出された。ろ紙中のムコ多糖の抽出には、煮沸あるいは超音波処理が必要であった。超音波処理は、時間的にも短く、一度に処理できる検体数も多かった。

ムコ多糖は、ジメチルメチレンブルーにて、クレアチニンは、ピクリン酸ナトリウムにてそれぞれマイクロプレート上で反応させ、共に 525nm の波長でマイクロプレートリーダーによる定量的測定が可能であった。この方法は、多数の検体を測定するのに優れており、スクリーニングの方法として有用であると考えられた。

クレアチニンの低い検体は、単位クレアチニン当たりでムコ多糖を算出したとき、正常児でも異常高値をとる危険があった。また、ムコ多糖症患者でも、正常域にはいる検体も存在した。他方、ムコ多糖値のみで表わした方が、正常児とムコ多糖症患者との区別が容易であった。

1 年前の尿ろ紙検体でもムコ多糖測定値に有為な変動はなく、尿ろ紙は、検体の保存にも輸送にも優れていると考えられた。