

# 厚紙を使用したDip法による 尿中VMAのマススクリーニング テストの改良

中田 利一 (名古屋市衛生研究所)

## 緒 言

昭和50年の我が国の統計では、小児癌による死亡者数は、年令層を0~4, 5~9, 10~14と分けて考えると、0~4歳が最も数が多く853人であった。その内、白血病系統を除いて最も数が多かったのは交感神経系の腫瘍であり、116例もあった<sup>1)</sup>。この腫瘍の特色は2つあり、1つは早期に発見すれば摘出除去でき根治する可能性が高いと言う事であり<sup>2)</sup>、もう一つの特色は、尿中に排泄される物質VMAを測定すれば容易に存在を推測できると言う事である<sup>3)</sup>。以上の事から、尿中VMAを測定する事によるマススクリーニングテストを行えば神経芽細胞腫の患児を早期発見し、早期治療へ導けるのではないかと期待を抱かせる。

尿中VMAの試験法としては、パラニトロアニリンジアゾ試薬を用いた噴霧法(一滴法)と、試験管法とがある。しかし、この方法は試薬が不安定で調製後120秒以内に利用しなければならぬ欠点があるとされている<sup>4)</sup>。噴霧法は排気装置のある所で行わねばならぬ点があり、どこでもできる方法であるとは言えない。この方法のもう一つの問題点は3~6か月児の尿をとる場合、採尿が実際問題として困難であると言うことである。採尿バッグを利用することは、費用の面からもマススクリーニングテストでは避けることが望ましいと考えられる。しかも、採尿バッグは実際に使用してみた感じでは、うまく採尿するまでには、熟練を要するように思えた。その他市販されている物として、やはりパラニトロアニリンジアゾ試薬を用いたVMA「コーワ試験法」がある。この方法による乳幼児尿のマススクリーニングテストの問題点としては、試験紙の保存時に湿度を避けることを必要とし、試験紙の有効期

限(6カ月)があり、採尿が困難であること、母親に自己判定させる時の混乱等がある。

その他に2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを使用する方法<sup>5)</sup>があるが、手順が複雑であり、採尿もむづかしく、乳児の尿のマススクリーニングテストには適さないように感じた。

以上の事から、パラニトロアニリンジアゾ試薬の不安定性と、マススクリーニングテストにおける採尿困難とを克服する方法を検討し、厚い濾紙(東洋濾紙№63, 濾紙は1.5cm×5cmに切断して用いた)を使用したDip法が良いと言う結論に達した。

その後、3カ月児健康診査で実際に使用したり、3カ月児又は6カ月児の尿を濾紙に染み込ませて衛生研究所へ郵送して貰ったりしながら、神経芽細胞腫のVMA検査をマススクリーニングテストとして実施するには、どのようにしたら良いかを検討して来た。その経過の中で3例の患児を発見して、専門病院へ紹介し、神経芽細胞腫と確認できた。今回は、その経過の概略を報告する。

## 実験方法および材料

### 1. 試薬

#### 1) 0.1%パラニトロアニリン溶液

パラニトロアニリン1gを濃塩酸20mlに加熱溶解し、水を加えて1000mlとする(試薬特級)(冷蔵)。

#### 2) 0.2%亜硝酸ナトリウム溶液(試薬特級)(冷蔵)。

#### 3) 1.0%炭酸カリウム(試薬特級)(用時調製)。

#### 4) 混合試薬

1):2):3)を1:1:2の割合に混じて用いる。上述の混合順序を守る。

#### 5) VMA溶液

シグマ製VMAで作製した。10, 20, 30, 40, 50, 100 µg/mlの液を作製。

### 2. 器具

1) 濾紙(東洋濾紙№1, 2, 24, 25, 26, 27, 28, 63, 131)。1.5cm×5cmに切断して用いた。

2) 保存袋。例えばチャック付ポリ袋(例えば、セイニチのユニパック、E-4、140×100×0.04、株式会社生産日本社)。この袋に上述の濾紙を入れて配布した。

3) 濾紙固定台、反応容器、鋏(チェス型)等は、大略図1の通りである。

## 結果および考察

### 1. Dip法の検討

神経細胞腫のマス スクリーニング テストは、予後から考えて1歳未満で行うのが望ましいが<sup>9)</sup>、しかし試験管法、一滴法のどちらも、1歳未満の乳幼児の尿のVMA検査を多数行うには、採尿の簡便さと言う面から考えると、改良の余地があると考え、その一つの例としてDip法を考案して検討した。

混合発色試薬が不安定であるので、その問題の解決法として、不安定であっても実際問題としてそれが問題とならないようにする方法を考えた。そのためには、短時間の内に尿と混合発色試薬とを接触させなければならない。そのため、小さな濾紙片に尿をしませて、それを棒に多数貼り付け、用意し、混合発色試薬を調合し、その中へ濾紙をDipし、反応させると言う方法を考えた。この方法によると、2分間で200検体余りを発色させる事ができる。

#### 1) 濾紙の大きさ

濾紙の大きさは、我々は1.5cm×5cmのものを使用している。これによれば37cmの台に、15枚を貼って検査できる。濾紙を台に固定するにはチェス型の鋏を用いると良い。

#### 2) 濾紙の種類を検討

検討した濾紙の種類は表1のとうりである。濾紙上でのVMAの発色度を検討した。まず正常尿でVMA標準水溶液を希釈し、VMA濃度が0、5、7、10、20、50μg/mlとなる溶液を準備した。試験紙に各溶液を吸着させ、固定台に固定し、約30分間風乾後混合発色試薬にひたし、試薬が試験紙に吸着され上昇してくる間、数秒間待つ。試験紙固定台を反応容器からはずし、風乾

台の上で風乾する。その結果、濾紙№63が他と比較して濃く着色した。№24、25、26、27がそれに次いだ。№28は色調にむらが生じた。また№1、2、131は濾紙が薄いため色調の変化が分りにくい欠点がある。濾紙の上でVMAと混合発色試薬とが反応して発色した色は非常に安定であり、室温では目で見える限り1週間以上色調に変化を認めなかった。この安定性は、濾紙の種類による差はなかった。以上の2つの点から、検討した濾紙の中では、東洋濾紙№63が最適であると考えた。

3) VMAが濾紙に付着してからの時間と环境温度との発色に及ぼす影響。

東洋濾紙№63を1.5cm×5cmに切って、VMAの水溶液5、10、20、50、100μg/mlの液を付着させ、チャック付ポリ袋に入れ、チャックをし、8、25、37℃の温度で1、2、3、4、6、7日間放置し、Dip法で発色させて、温度、時間の影響を調査した結果を表2に示す。この結果から考えて、温度・時間の影響は、実際問題として、無視しようと考えている。

#### 4) 混合発色試薬のDip法における安定性

混合発色試薬の室温での放置時間と濾紙に吸着したVMAとの反応を検討した。混合発色試薬を調製後、0、1、2、4、6、10、15、30、60、120分および18時間後に、直前に濾紙に吸着されたVMAと反応させ、その発色を見た。

0分では、濾紙に吸着されたVMAは直ちに発色する。しかし、1分、2分後では、しばらくして発色し、4、6、10、15、30、60、120分後と、時間の経過と共に発色に要する時間は長くなかったが、試験紙が乾く約2時間後においては、0分から120分後のすべてが同一の色調となった。しかし18時間放置した場合発色試薬は、それ自体に沈澱を生じ、濾紙に吸着されたVMAとの反応も全く起らなかった。佐藤等の方法<sup>4)</sup>では、試薬混合後2分以内に使用せよと成っているが、2分以内と言うのは、直ちに発色するための条件であって、発色までの時間(反応時間)を長くすれば、発色は同じとなり、混合発色

試薬自体は、室温に放置しても約2時間までは安定であると考えられる。

2. 保健所における3ヶ月児検診でのDip法の利用の経験

現在迄の経験をのべると、概略であるが、一次検査11, 411例, 二次検査270例, 精密検査18例, 臨床評価を行ったもの3例, この3例はいずれも神経芽細胞腫であった。陰性と判定した11, 141例の中に, 6カ月後に神経芽細胞腫を発症した1例があった。

引用文献

1) 厚生省大臣官房統計情報部編：昭和50年人口動態統計下巻, p92

2) Christopher's Textbook of Surgery. Seventh Edition. W.B. Saunders Company. p378 と p839  
 3) Merck Manual, Twelfth Edition, p1797  
 4) 佐藤辰男等：最新医学, 16, 371 (1961).  
 5) Rogers, L.E., et al : Am. J. Clin. Pathol. 58, 383 (1972)  
 6) 日本小児外科学会悪性腫瘍委員会：日本小児外科学会雑誌, 15(7), 1085 ~ 1111 (1979)

表1 検討したろ紙の種類

種類	厚さ (mm)	繊維密度
東洋 1	0.20	粗 大
2	0.26	中
131	0.25	微 細
24	0.75	少々粗
25	0.90	〃
26	0.70	中
27	0.70	少々微細
28	0.70	微 細
63	1.00	粗 大

表2 VMA溶液を付着した濾紙の  
放置時間及び温度の発色への影響

放置温度 ℃	VMA濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	放置時間(日)					
		7	6	4	3	2	1
8	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	20	++	++	+	+	++	++
	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	5	+	+	±	+	±	±
	10	+	+	+	+	+	+
	20	+	++	+	+	++	+
	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37	5	±	±	±	±	±	±
	10	±	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	++	++	++
	50	++	++	++	++	++	++
	100	++	++	++	++	++	++

一、紫色が付かぬ；±、薄く紫色；+、紫色に着色；  
++、+と++の間の濃さ；+++、濃紫

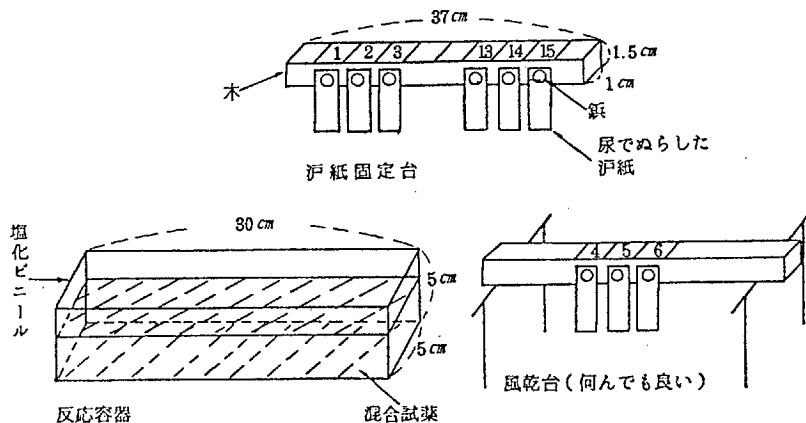
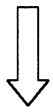


図1



## 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



### 緒言

昭和 50 年の我国の統計では,小児癌による死亡者数は,年齢層を 0~4,5~9,10~14 と分けて考えると,0~4 歳が最も数が多く 853 人であった。その内,白血病系統を除いて最も数が多かったのは交感神経系の腫瘍であり,116 例もあった。この腫瘍の特色は 2 つあり,1 つは早期に発見すれば摘出除去でき根治する可能性が高いと言う事であり,もう一つの特色は,尿中に排泄される物質 VMA を測定すれば容易に存在を推測できると言う事である。以上の事から,尿中 VMA を測定する事によるマススクリーニングテストを行えば神経芽細胞腫の患児を早期発見し,早期治療へ導けるのではないかと期待を抱かせる。

尿中 VMA の試験法としては,パラニトロアニリン ジアゾ試薬を用いた噴霧法(一滴法)と,試験管法とがある。しかし,この方法は試薬が不安定で調製後 120 秒以内に利用しなければならぬ欠点があるとされている。噴霧法は排気装置のある所で行わねばならぬ点があり,どこでもできる方法であるとは言えない。この方法のもう一つの問題点は 3~6 か月児の尿をとる場合,採尿が実際問題として困難であると言うことである。採尿バッグを利用することは,費用の面からもマススクリーニングテストでは避けることが望ましいと考えられる。しかも,採尿ノックは実際に使用してみた感じでは,うまく採尿するまでには,熟練を要するよう思えた。その他市販されている物として,やはりパラニトロアニリンジアゾ試薬を用いた VMA「コーワ試験法」がある。この方法による乳幼児尿のマススクリーニングテストの問題点としては,試験紙の保存時に湿度を避けることを必要とし,試験紙の有効期限(6 ヶ月)があり,採尿が困難であること,母親に自己判定させる時の混乱等がある。その他に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを使用する方法があるが,手順が複雑であり,採尿もむずかしく,乳児の尿のマススクリーニングテストには適さないように感じた。

以上の事から,パラニトロアニリン ジアゾ試薬の不安定性と,マス スクリーニング テストにおける採尿困難とを克服する方法を検討し,厚い濾紙(東洋濾紙 63,濾紙は 1.5 cm x 5 cmに切断して用いた)を使用した Dip 法が良いと言う結論に達した。

その後,3 ヶ月児健康診査で実際に使用したり,3 ヶ月児又は 6 ヶ月児の尿を濾紙に染み込ませて衛生研究所へ郵送して貰ったりしながら,神経芽細胞腫の VMA 検査をマス スクリーニ

ングテストとして実施するには、どのようにしたら良いかを検討して来た。その経過の中で3例の患児を発見して、専門病院へ紹介し、神経芽細胞腫と確認できた。今回は、その経過の概略を報告する。