

(10) スポット法発色後の急速展開処理

鈴木 重任
武士 俣 邦 雄

(東京都立衛生研究所)

研究目的

東京都においても昭和58年10月より多摩及び島嶼に対し神経芽細胞腫のマス・スクリーニングをスポット法⁽¹⁾で行ってきたところである。この方法は尿中VMAをパラニトロアニリンとジアゾカップリングさせ、その紫色の色調を肉眼で判定するものであり、いくつかの問題が指摘されているが、その一つに尿中に存在する物質が上記の反応により褐色の色素を生じ、VMAによる紫色に重なって色調が不鮮明となり判定が困難になることがあげられる。このことは、当研究班内で行われた精度管理調査に於て、濃縮尿の場合に判定のばらつきが大きくなったことからもうかがわれる。我々は、通常のスポット法で発色した後、疑わしい検体についてこの褐色物質を迅速にとり除き判定を容易にする方法を試みているので報告する。

研究方法

50mlの注射器の外筒に、先端を直角に切りとった25Gの注射針を付ける。1%炭酸ナトリウム(又はカリウム)9容に1容のエチルアルコールを加えた展開液⁽²⁾約15mlを注射筒に入れる。常法⁽³⁾に従って発色させ、自然乾燥したスポットろ紙(東洋ろ紙No.2)を手で水平に保持し、スポットのほぼ中央に上記の注射針を垂直にかるくあて、展開液が自然にしみて行くようにする。スポット外縁まで展開液が達した時(約20秒後)針をはなす。褐色のリングが外側へ広がっていき、内側に紫色のリングが残る。この内側のリングの色調により判定する。乾燥後、クロマトスキャナー(島津cs910)で反射光を550nm及び450nmで記録した。(stage速度40mm/min, Paper速度40mm/min)

研究結果

VMA標準水溶液(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と患者尿を上記の方法で展開する前後のクロマトグラムを図1.に示す。左側の550nmでの測定では、展開後内側の紫色のピークが高く、外側の褐色のピークは低く出ている。患者尿については、展開後の内側の紫のリングは展開前のスポット(直径1.5cm)より直径で約1.5mm大きくなっているのみであるが、外側の褐色のリングは直径で約1.7cm外側にはずれ、紫色のリングとの間に巾4mmの白い帯ができています。図1.の右側のクロマトグラムは左側と同一試料を450nmで測定したもので、550nmの場合とは逆に外側の褐色のピークが高く、内側の紫色のピークは低く記録されている。紫色のリングのピークの高さを550nmと450nmの差で見ると、展開前と展開後でほとんど変化していない。

スタンダードの場合も外側にうすい褐色のリングができていますがこれはろ紙中の不純物とパラニトロアニリンが反応してできた物質のためと思われる。実際のマス・スクリーニングの陰性検体の3例を図2.に示す。図1.と同様に展開により紫色のリングは1～1.5 mm広がるが550 nmのピークの差は展開の前後で変わらず外側の褐色のリングと内側の紫色のリングは明瞭に分かれている。一番左側の例の中央部のピークは、ろ紙上に印刷された尿滴下の目標のための×印である。

考 察

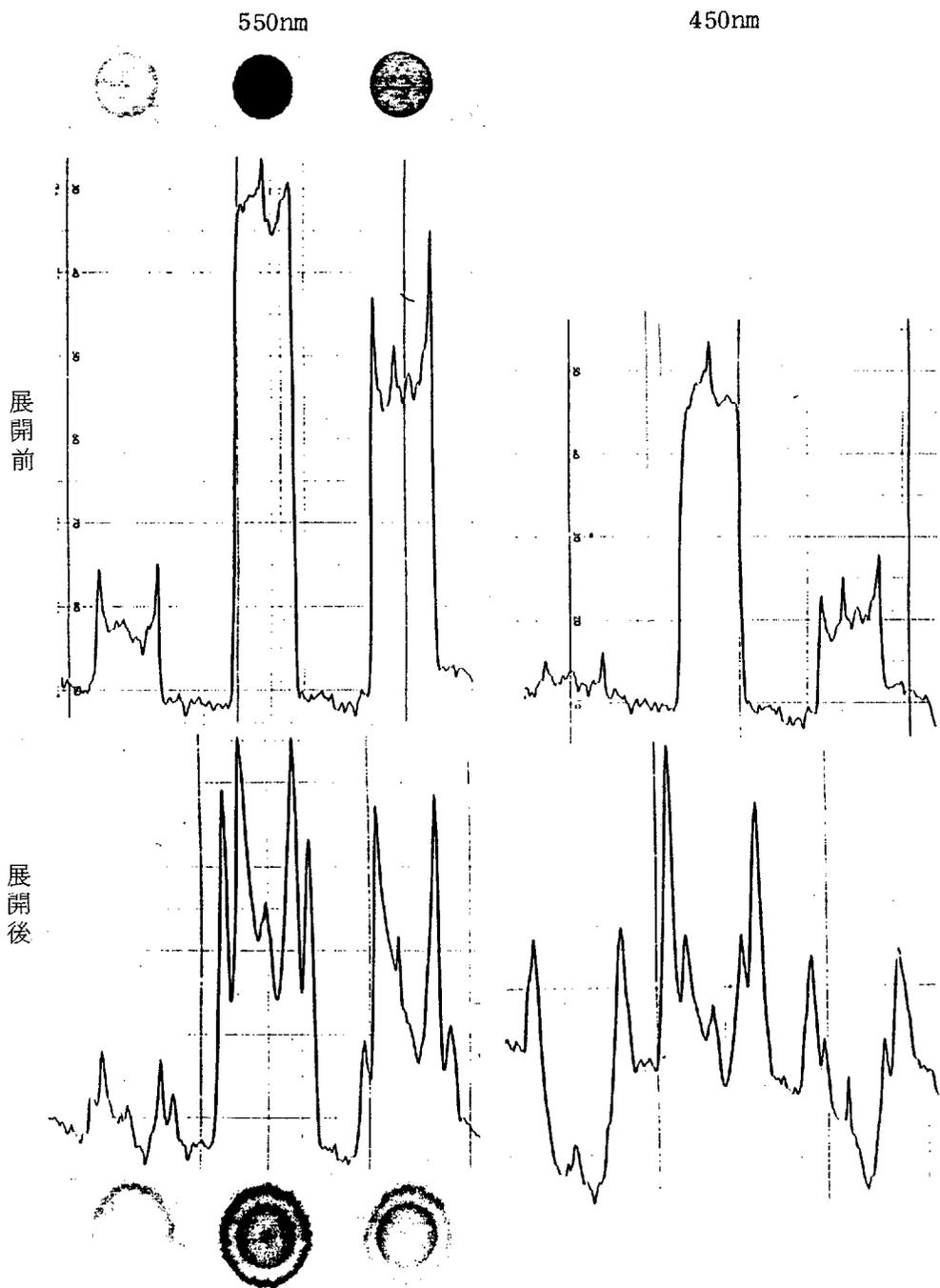
VMAスポットテストは迅速で簡易なためマス・スクリーニングとして優れた方法であるが、昨年度の報告書で述べたように、食物由来の、グアヤコール核側鎖の α 位炭素がアルコール又はカルボニルの物質は全てVMAと同一の色素を生じるため食餌制限がどうしても必要であるという問題がある。もう一つの問題は尿中褐色物質のために発色が不鮮明となり、時に肉眼での判定が困難になることである。我々の試みたエタノール炭酸ナトリウムによる急速展開の方法はこの尿中褐色物質を迅速に(数十秒)とり除く方法であり、特別の機器を必要とせず、開放系で行える利点がある。紫色のリングを550 nmと450 nmの差でみると、展開によってほとんど変化がなく、色が薄くなることはなかった。これは尿がスポットされた時すでに周辺に多く集っていたVMAはこの展開によってほとんど動く時間がなく、スポット中心部よりのVMAは周辺に移動する傾向があるためと思われる。それに対して尿中褐色物質、あるいはろ紙中の不純物は急速に外側へ流されていきVMAによる紫色と分離するのであろう。ジアゾ反応によりピンク色の色素を生じるフェノールを尿に加えて同様の処理を行うと、VMAによる紫と同様な動きを示し、この方法ではVMAと分離することはできなかった。おそらくあまりに急速で短時間のためと思われるが、この場合でも尿褐色物質が共存する状態より色調は鮮明で判定ははるかに容易になる。

ま と め

通常のスポット法で発色した後に判定困難な検体に対して10%エタノール炭酸ナトリウムによる急速展開を行い、尿中褐色物質をとり除くことによって判定を容易にすることができた。この方法により東京都下では昭和58年4月より12月までの間に総数25,535名のスクリーニングを行い、再検3,044件、精検3名でそのうち1名は入院中3日間VMA高値を示したが後低値となり臨床的に腫瘍が発見されないので外来的に経過を観察している。患者の発見は0名である。

文 献

- (1) La Brosse, E. H. : Proc. Am. Cancer Res. 9, 39, (1968)
- (2) 永原 暎 : 神経芽細胞腫マス・スクリーニング 174 P,
(1984) 母子愛育会編
- (3) 沢田 淳 他 : 周産期医学, 5, 62, (1975)



20ug/ml 患者尿 100ug/ml

図1. 展開処理前後のクロマトグラム (スタンダード及び患者尿)

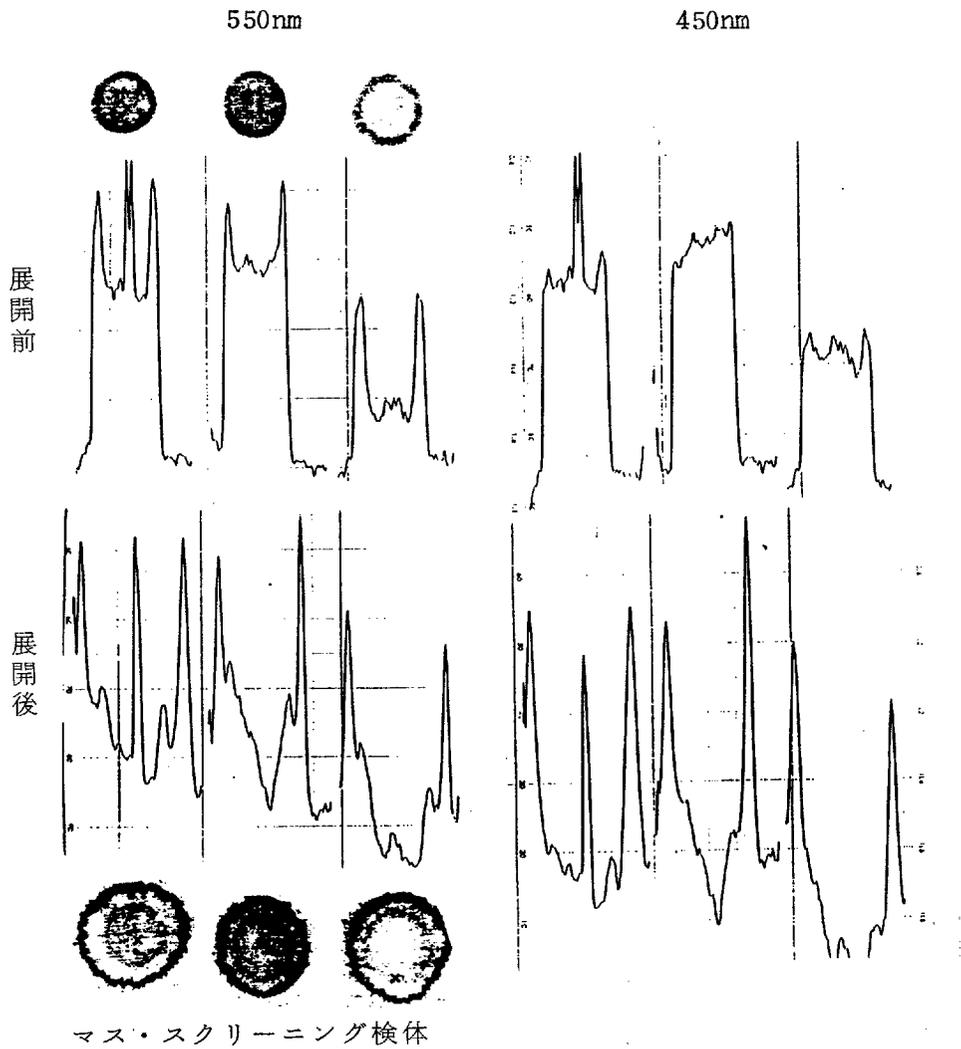
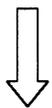


図 2. 展開処理前後のクロマトグラム (マス・スクリーニング検体例)



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



研究目的

東京都においても昭和 58 年 10 月より多摩及び島嶼に対し神経芽細胞腫のマス・スクリーニングをスポット法(1)で行ってきたところである。この方法は尿中 VMA をパラニトロアニリンとジアゾカップリングさせ、その紫色の色調を肉眼で判定するものであり、いくつかの問題が指摘されているが、その一つに尿中に存在する物質が上記の反応により褐色の色素を生じ、VMA による紫色に重なって色調が不鮮明となり判定が困難になることがあげられる。このことは、当研究班内で行われた精度管理調査に於て、濃縮尿の場合に判定のばらつきが大きくなったことからもうかがわれる。我々は、通常のスプレッド法で発色した後、疑わしい検体についてこの褐色物質を迅速にとり除き判定を容易にする方法を試みているので報告する。