

1,9-Dimethylmethylene Blue を用いたムコ多糖症マス・スクリーニング法の検討  
(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

折居 忠夫

遺伝性ムコ多糖代謝異常症は、酸性ムコ多糖の分解に関与するリソソーム酵素の異常により発症する先天性代謝異常症である。本症は出生 26,000 に1人の割合で発症し、先天代謝異常症の中では比較的多い疾患である。しかも本症は臨床的には1歳から5歳頃に診断される症例が多く、確定診断時には弟妹の発症をみている場合も少なくない。一方ムコ多糖症の治療として現在骨髄移植が行なわれているが、その経験から乳児期早期の骨髄移植がより効果的であることが実証されてきている。以上より、ムコ多糖症では症状発現前の乳児期マス・スクリーニングによる早期診断が重要であり、その方法の開発は急務である。最近、1,9-dimethylmethylene Blueを用いた簡易な尿中ムコ多糖の測定法(DMB法)が報告され、マス・スクリーニングへの応用が試み始められている。

本研究では DMBを用いたムコ多糖症の診断法を改良し、乳児期を対象としたマス・スクリーニング法へ応用し得る可能性を検討した。

見出し語：ムコ多糖症、1,9-Dimethylmethylene Blue、尿中ムコ多糖、早期診断

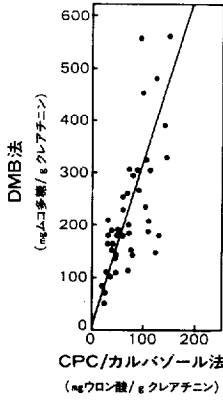
【研究方法】

1. 尿検体は各月例の健康な乳児493名、6か月児345名、既に診断されているムコ多糖症児 2名(ⅢA型1例、Ⅶ型1例)について測定した。また文献上報告されているムコ多糖症 2名のDMB法による測定値を引用した<sup>1)</sup>。

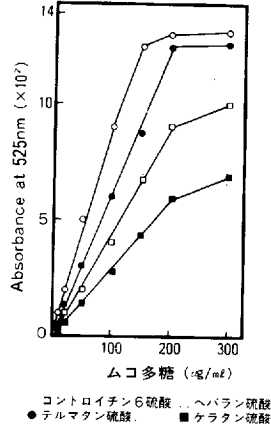
2. 尿中ムコ多糖の定量は、3000rpm, 10

min. の遠心上清10 $\mu$ lに35 $\mu$ M 1,9-Dimethylmethylene Blue / 50mM ギ酸バッファー(pH 8.5) 1.0 ml を加えて攪拌後直ちに525nmにて吸光度を測定した。検量線はコンドロイチン6硫酸を用いて作成した。クレアチニンは Jaffe法、ウロン酸は Bitter-Muir法にて測定した。

DMB法とCPC/カルバゾール法との相関性



各種ムコ多糖の1,9-ジメチルメチレンブルーに対する反応性



【結果】

1. DMB法とCPCカルバゾール法との相関性について：従来よりムコ多糖症スクリーニングに用いられているCPC/カルバゾール法との相関を46例の尿を用いて検討したところ、 $r=0.52$ で両者の測定値には相関性が認められた。

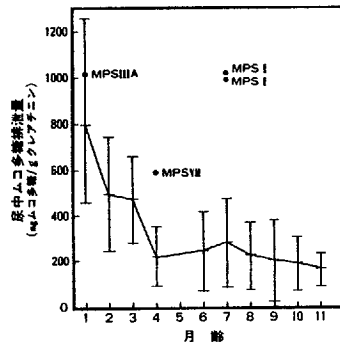
2. 各種ムコ多糖とDMBとの反応性について：C6S, DS, HS, KSの各々で反応性は異なるが、0-150 $\mu\text{g/ml}$ までの範囲で直線性が認められた。CPC/カルバゾール法ではほとんど検出出来ないKSについても吸光度は低いながらも0-200 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性が認められた。

3. DMB法による乳児尿中ムコ多糖排泄量について：尿中ムコ多糖/クレアチニン比は生後1カ月が最も高く、月齢とともに低下する傾向が認められた。4カ月から11カ月の尿中ムコ多糖量は、平均160-280 $\text{mg/g}$ クレアチニンであった。一方、4例のムコ多糖症乳児の尿中ムコ多糖値はそれぞれ1019(ⅢA型1カ月)、635

(Ⅶ型4カ月)、1001(I型7カ月)および996(I型7カ月)であり、有意に高値を示した。

4. 6カ月児の尿中ムコ多糖排泄量について：マススクリーニングの施行対象として検討している6カ月児の尿345例につき尿中ムコ多糖を測定した結果、平均値257 $\text{mg/g}$ クレアチニン、標準偏差174であった。cut of pointを600 $\text{mg/g}$ クレアチニンに定めた時、偽陽性は全体の4.9%であった。

DMB法による尿中ムコ多糖排泄量と月齢との関係 (健康人493名、MPS4名)



5. 偽陽性を呈した6カ月児の採尿方法、採尿時の状態について：345検体中15例の偽陽性検体について採尿方法等に関する調査を行ない偽陽性因子を検討した。回答が得られた11例中7例で指示されたとおりの採尿がなされおらず、紙おむつ成分または便の混入が偽陽性因子になると考えられた。

①紙おむつ成分混入の影響について：主な市販紙おむつ8種類に、過剰量の精製水を加えて37℃で一晩インキュベートし、水溶性物質を抽出してDMB反応を行なった。その結果、7種類の紙おむつでDMB反応が陽性であった。同抽出液をMPSペーパー、ウロン酸測定したところ、MPSペーパーでも陽性反応が認められた。

②便成分混入の影響について：6カ月児の健康便スパーテル一杯を50mlの精製水に懸濁し3000rpm, 10min.の遠心上清についてDMB反応を行なった。懸濁液は遠心操作を加えても透明にならず、測定値は一定しなかった。

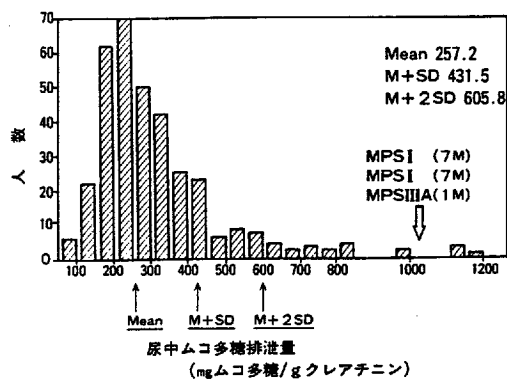
#### 【考察】

DMBによる尿中ムコ多糖測定法は2-3の報告例があるが<sup>1, 2)</sup>、本研究ではより簡便で微量の検体(10 $\mu$ l)で測定出来る方法に改良した。また、その測定値は従

岐阜大学小児科

(Dep. of Pediatrics, Gifu Univ.)

DMB法による6カ月児の尿中ムコ多糖排泄量 (345名)



来のCPC/カルバゾール法とも相関することが認められた。そして健康乳児に比しムコ多糖症乳児では有意に高値を呈し、本法が乳児期ムコ多糖症マスキリングに応用し得ることが示された。さらに、偽陽性因子について検討した結果、1. 紙おむつ成分の混入、2. 便の混入が偽陽性因子となることが明らかになった。したがって採尿方法の指導により偽陽性率は減少するものと考えられる。

現在本法の自動化について検討中であるが、さらに測定精度を向上させた簡便なシステムを作る予定である。

#### 【文献】

1. Whitley, C. B. et al. Clin. Chem. 35, 2074-2081, 1989
2. de Jong, J. G. N. et. al. Clin. Chem. 38, 803-807, 1992



**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



遺伝性ムコ多糖代謝異常症は、酸性ムコ多糖の分解に関与するリソソーム酵素の異常により発症する先天性代謝異常症である。本症は出生 26,000 に 1 人の割合で発症し、先天代謝異常症の中では比較的多い疾患である。しかも本症は臨床的には 1 歳から 5 歳頃に診断される症例が多く、確定診断時には弟妹の発症をみている場合も少なくない。一方ムコ多糖症の治療として現在骨髄移植が行なわれているが、その経験から乳児期早期の骨髄移植がより効果的であることが実証されてきている。以上より、ムコ多糖症では症状発現前の乳児期マス・スクリーニングによる早期診断が重要であり、その方法の開発は急務である。最近、1,9-dimethylmethylen Blue を用いた簡易な尿中ムコ多糖の測定法(DMB 法)が報告され、マス・スクリーニングへの応用が試み始められている。

本研究では DMB を用いたムコ多糖症の診断法を改良し、乳児期を対象としたマス・スクリーニング法へ応用し得る可能性を検討した。