

ムコ多糖蓄積症のマススクリーニング：乾燥尿濾紙を用いたDMB法の検討

(分担研究：マススクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢及びスクリーニング法に関する研究)

呉 繁夫、青木 洋子、池田 博行、小笠原 正人、高野 英行、
高橋 和俊、綿谷 かおる、成澤邦明

<要約>

酸性ムコ多糖蓄積症の乾燥濾紙尿を用いたマススクリーニングへ向けての基礎的研究を行った。まず、原尿を用いた系では10 μ lの尿で十分定量可能であることを確認の上、乾燥尿濾紙の検討を行った。各種のグリコサミノグリカン (GSG) の水溶液を濾紙 (東洋濾紙、VMA327) にしませて乾燥後、直径3 mmの濾紙円盤10個 (70mm²分の濾紙、10 μ l相当の溶液成分を含む)をパンチし蒸留水を用いて溶出したところ、良い回収が得られDMB法による定量が可能であった。ところが、GSGと正常尿とを混和後同様の方法で溶出を試みたところ、その回収は悪くDMB法によるGSG定量は困難であった。そこで、回収率の改善のため、加熱処理、超音波処理、蛋白分解酵素 (protenase K)処理、濾紙の種類を検討を行った。このうち最も良い回収を示したのは蛋白分解酵素処理で、次が濾紙をWhatmann社3MM濾紙に変更することであった。以上の結果から乾燥尿濾紙 (特にVMA 327を用いた際) 中のGSGは他の尿成分 (蛋白分解酵素処理が奏功する事から恐らく蛋白成分) によりその回収ないしは呈色が阻害されていると思われ、マススクリーニングの実施にあつたては濾紙中GSGの回収法の詳細な検討が必要と思われた。

<見出し語>

ムコ多糖蓄積症、グリコサミノグリカン、dimethyl-methylene blure, 乾燥尿濾紙、蛋白分解酵素処理

東北大学医学部病態代謝 (Department of Biochemical Genetics, Tohoku University School of Medicine)

<研究方法>

1. DMB法によるG S Gの定量: 1,9-Dimethyl-methylele blue (Aldrich)を0.18mM Tris-50mM formate buffer (pH8.8) (10 x 呈色溶液) に溶解したものを10 x 色素溶液とした。サンプルと混合して最終濃度が1 x となるように希釈して525nmの吸収を測定した¹⁾。

2. 尿検体及びG S G: 正常尿検体は6カ月乳児のものを使用した。各種ムコ多糖蓄積症患者の尿検体は岐阜大学医学部小児科より供与された。G S G標品(ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸A及びC、デルマトン硫酸)は生化学工業より入手した。

3. 濾紙及び抽出法: 東洋濾紙VMA 3 2 7とWhatmenn 3 MMの2種類を使用した。100ml尿またはG S G溶液を濾紙に滴下すると約30mmのスポットを形成する。これより10個の3mm径の濾紙円盤をパンチし(原尿10 μ lに相当)180 μ lの溶液にて抽出した。抽出には次の方法を用いた。

1) 蒸留水180 μ lで抽出中に加熱処理(100度15分)を加える。

2) 蒸留水180 μ lで抽出中に超音波処理(Sharp UT-104にて15分)を加える。

3) 1x呈色溶液に200 μ g/mlのproteinase Kを加えた酵素溶液180 μ lにて55度60分抽出。

4) 濾紙をVMA 3 2 7からWhatmann社の3MMへ変更する。

4. クレアチニン定量: 和光純薬工業のクレアチニンWako測定キットを用いた。

<結果>

1. まず、原尿をそのまま用いる方法であれば1 x 色素溶液1ml中に患者原尿10 μ lを加えることにより十分な呈色が得られることを確認した。

2. G S G標品の25, 50, 100, 200, 300 μ g/ml水溶液を製作し、これを100 μ lずつ濾紙にスポットし上述の方法で抽出を試みたところ図1の様な回収を得た。

3. G S G標品を今度は正常尿にて希釈し2の様な希釈系列を製作し同様に回収を試みると図2の様にほとんど回収されなかった。

4. そこでこのG S G標品含有の尿サンプルを用いて各種の抽出方法の検討を行った結果を図3に示す。その結果、超音波処理ではほとんど回収率の改善は改善されなかったが、加熱処理ではヘパラン硫酸などに関して多少の改善が見られた。濾紙をVMA 3 2 7からWhatmann社3MMへ変更すると回収はかなり改善したがG S Gの種類によりかなりのばらつきが認められた。最も良い結果を見たものはproteinase K処理であり、各G S G間の抽出格差も最も少なかった。

5. 3例の正常尿と3例のムコ多糖蓄積症患者の尿を3MM濾紙にしませ前述の方法でパンチを行いproteinase K処理によってG S Gの抽出液を製作した。この抽出液からG S G濃度とクレアチニン濃度の比を測定すると表のごとくムコ多糖蓄積症患者の値は高く両者の区別は一応可能であった。

<考案>

ムコ多糖蓄積症のマスキングを実施するにあたり尿検体の採取及び輸送法としては原尿のままではその扱いがかなり困難と思われる。そのため現行の神経芽細胞腫のスクリーニングの様に尿濾紙を用いることが現実的であると考えられる。

まず、濾紙の種類を検討すると、予想に反して神経芽細胞腫に用いられているVMA 3 2 7濾紙はG S Gの回収が3MM型の濾紙よりかなり悪いことが判明した。また、今回試した抽出法の中ではproteinase K処理が最も良い回収を示した。Whitleyら²⁾は3x10cm (30cm², 原尿5ml相当)の尿濾紙を3.5mlの蒸留水で抽出する方法を報告しているが、原尿を用いたDMB法は尿量約10 μ lで検査可能である³⁾ことを勘案するとこの方法による濾紙からの回収はかなり悪いと思われる。それに対してproteinase K処理を行えば約1cm²程度の濾紙でDMB法によりG S G測定が可能であると思われ、更に、de Jongらの指摘しているDMB法の尿中蛋白質による呈色反応の阻害もこの蛋白分解酵素処理により回避できると考えられる。本法の実施に当たっては各尿間での回収のばらつきの問題が大きいと考えられこの面での検討が必要であると考えられた。

<文献>

- 1) Whitley, CB., Ridnour, MD., Draper, KA., et. al. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. 35:374-379, 1989.
- 2) Whitley, CB., Draper, KA, Dutton, CM., et. al. Diagnostic test for Mucopolysaccharidosis. II Rapid quantitation of glycosaminoglycan in urine sample collected on a paper matrix. Clin. Chem., 35:2074-2081, 1989.
- 3) De Jong, JGN., Wevers, RA., van Sambeek, RL., Measuring Urinary Glycosaminoglycans in the presence of protein: An improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. Clin. Chem. 38:803-807, 1992.

図1 G S G 標品の回収(水溶液)

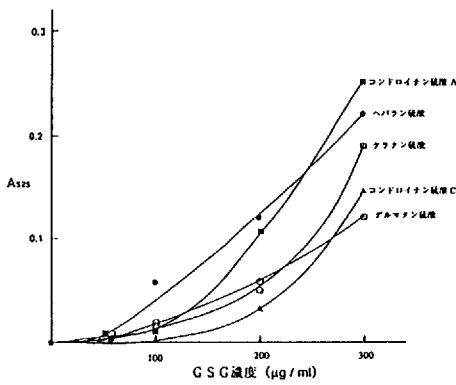


図2 G S G 含有尿検体からの回収

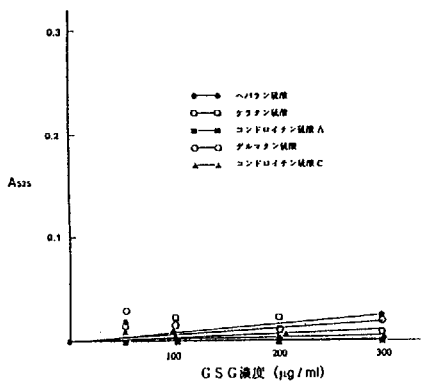


図3A 加熱処理

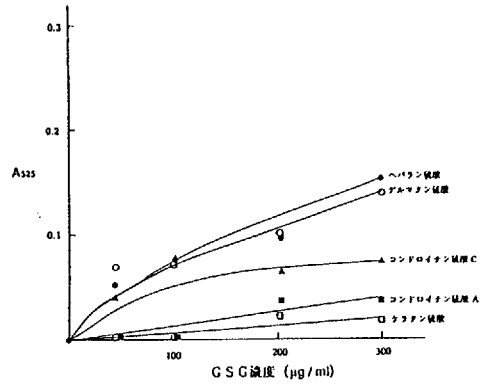


図3B Proteinase K 処理

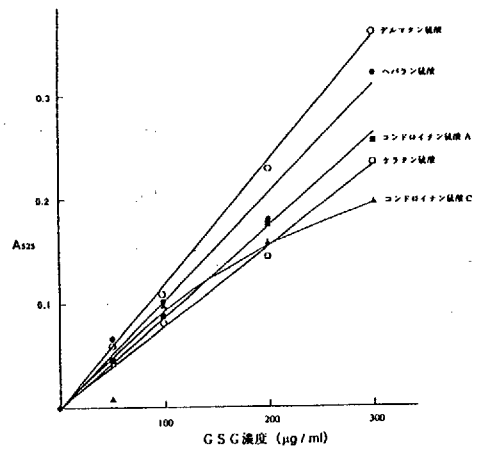


図3C Whatmann 3MM

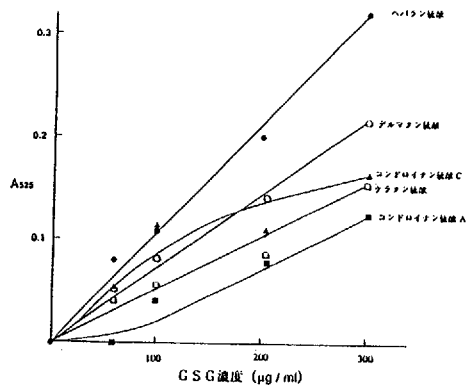


表 Proteinase K 処理によるM S P 患者尿濾紙からのG S G 回収

	Control			MPS		
	1	2	3	1	2	3
A525	0.11	0.21	0.18	0.486	0.29	0.28
Cr (mg/dl)	0.66	2.0	1.1	1.7	1.1	0.9
A525/Cr	0.17	0.10	0.16	0.29	0.26	0.31



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

酸性ムコ多糖蓄積症の乾燥濾紙尿を用いたマスキングへ向けての基礎的研究を行った。まず、原尿を用いた系では10 μ lの尿で十分定量可能であることを確認の上、乾燥尿濾紙の検討を行った。各種のグリコサミノグリカン(GSG)の水溶液を濾紙(東洋濾紙、VMA327)にしまして乾燥後、直径3mmの濾紙円盤10個(70mm²分の濾紙、10 μ l相当の溶液成分を含む)をパンチし蒸留水を用いて溶出したところ、良い回収が得られDMB法による定量が可能であった。ところが、GSGと正常尿とを混和後同様の方法で溶出を試みたところ、その回収は悪くDMB法によるGSG定量は困難であった。そこで、回収率の改善のため、加熱処理、超音波処理、蛋白分解酵素(protienase K)処理、濾紙の種類を検討を行った。このうち最も良い回収を示したのは蛋白分解酵素処理で、次が濾紙をWhatmann社3MM濾紙に変更することであった。以上の結果から乾燥尿濾紙(特にVMA327を用いた際)中のGSGは他の尿成分(蛋白分解酵素処理が奏功する事から恐らく蛋白成分)によりその回収ないしは呈色が阻害されていると思われ、マスキングの実施にあつたては濾紙中GSGの回収法の詳細な検討が必要と思われた。