

## ムコ多糖蓄積症のマスクリーニング

### —VMA 3 2 7尿濾紙からの酸性ムコ多糖の抽出法の検討—

(分担研究：マ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、坂本 修、高橋 和俊  
長崎 裕、武藤 嘉子、綿谷 かおる、成澤邦明

#### <要約>

酸性ムコ多糖蓄積症のマスクリーニングへ向けて、現行の神経芽細胞種のマスクリーニングに用いられているVMA327（東洋）濾紙にしまった尿検体からのグリコサミノグリカン（GSG）の抽出法の基礎的検討を行った。まず、各種のGSGの水溶液を濾紙にしませて乾燥後、蒸留水を用いて溶出したところ、ある程度の回収が得られたが、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、その回収は極めて悪かった。そこで、様々の抽出緩衝液のpHとモル濃度を検討したところ、酸性尿とアルカリ性尿ではその溶出態度に大きな開きがあり、アルカリ性尿の場合は比較的容易に抽出されるが、酸性尿ではpH9.0以上で200-500mMのトリス蟻酸緩衝液ではじめて十分な抽出が可能であった。VMA 3 2 7濾紙をもちいてマスクリーニングを行う場合、GSGの溶出態度を十分にモニターする必要があると考えられた。

#### <見出し語>

ムコ多糖蓄積症、グリコサミノグリカン、DMB法、VMA327、pH

---

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GSGの定量: 1,9-Dimethyl-methylene 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。
2. 尿検体及びGSG: 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児の尿検体は岐阜大学医学部小児科より供与された。GSG標品 (ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸C) 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 27とWhatmenn 3 MMの2種類を使用した。100ml尿またはGSG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 $\mu$ lに相当) 180 $\mu$ lのトリス蟻酸緩衝液にて抽出した。抽出液のpH、モル濃度を種々の条件で行いその効率を比較した。
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。
5. 6例の正常尿と6例のムコ多糖蓄積症患者の尿を3MM濾紙にしませ250mMトリス蟻酸緩衝液 (pH9.0) にてGSGの抽出液を製作した。この抽出液からGSG濃度とクレアチニン濃度の比を測定した。

## <結果>

1. GSG標品の200 $\mu$ g/ml水溶液を製作し、これを100 $\mu$ lずつ濾紙にスポットし上述の方法で各種のpHで抽出を試みたところ図1の様な回収を得た。
2. GSG標品を今度はアルカリ性 (pH8.5) と酸性 (pH5.3) 正常尿で200 $\mu$ g/mlとし、1と同様な実験を行うとアルカリ性尿に比べて酸性尿はその抽出が酸性領域で著しく悪かった (図2、3)。抽出効率の悪い酸性尿の抽出検体の実際のpHを測定すると図3の括弧内に示すように抽出緩衝液のpHに達しておらず10mM程度のトリス蟻酸緩衝液では酸性尿からのGSGの抽出は困難であることが判明した。

3. そこで抽出する緩衝液のモル濃度を検討した結果を図4、5に示す。アルカリ性尿の場合低濃度の緩衝液でも抽出は容易であったが、酸性尿の場合はかなり高い濃度 (200-500mM) を必要とした。
4. 正常対照者とムコ多糖症患者の濾紙尿を用いてGSGとクレアチニン比を求め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現行の神経芽細胞腫のスクリーニングの濾紙尿検体を用いることが出来るかどうかは実際上重要な問題となる。3MM濾紙からの抽出法についてはWhitleyらが報告している(1)。ところが、VMA 3 27濾紙は水抽出を行った場合、GSGの回収が3MM濾紙などに比べてかなり悪いことは昨年度に報告した。

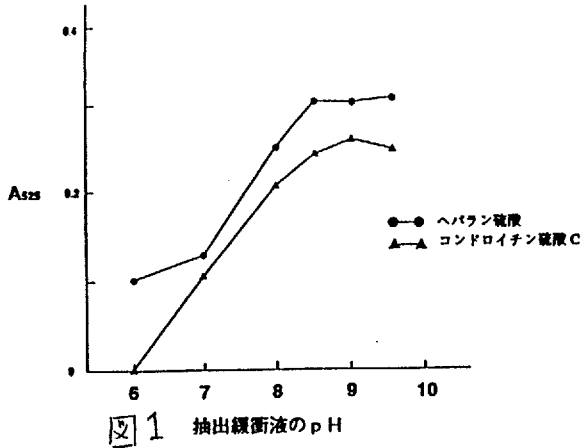
今回、VMA 3 27濾紙からのGSG抽出条件を検討したところ、抽出緩衝液のpHは9.0以上にしないと酸性尿からの効率的な抽出が行えなかった。次に緩衝液のモル濃度は酸性尿の場合かなり緩衝作用の強いものが存在し十分な抽出を行うためには高いモル濃度 (200-500mM) を要することが分かった。

クレアチニンの抽出効率はさほどpHに依存しない。一方、GSGの抽出効率はpHに大きく依存している。したがって、不適切な抽出条件は両者の比のばらつきを大きくする要因になり得ると推察された。この事は特にムコ多糖症患者の尿のpHが強い酸性を示す際に偽陰性を生じる可能性を示唆し、マスキングを実施する際にはGSGGSGの抽出効率の管理が課題であると思われる。

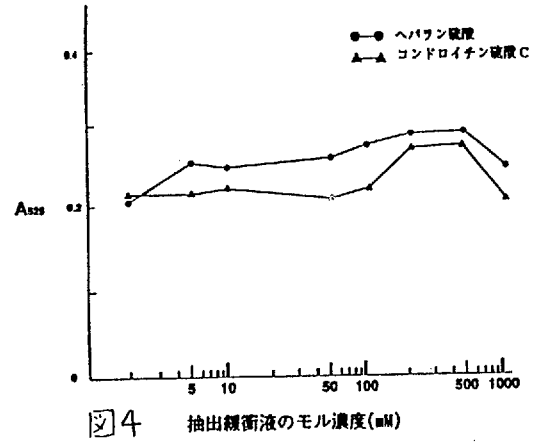
## <文献>

- 1) 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.

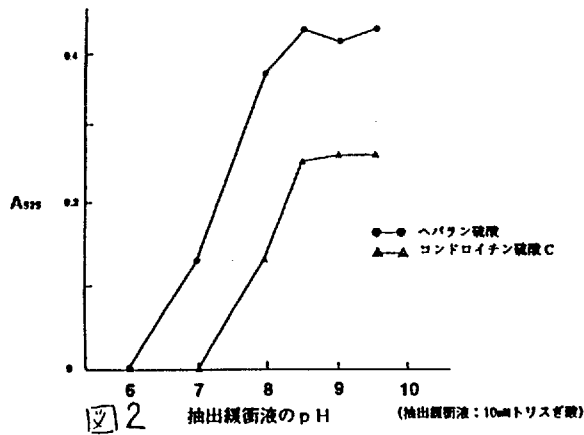
G.S.G 標品のVMA327濾紙からの各種pHにおける抽出  
(抽出緩衝液: 10mMトリス緩液)



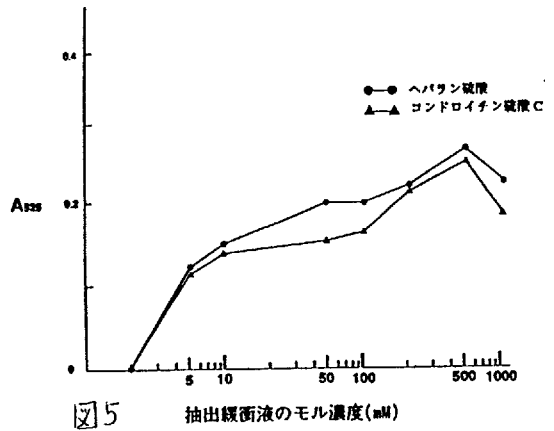
G.S.G含有尿からの各種モル濃度での抽出ーアルカリ性尿の場合  
(抽出緩衝液: pH9.0トリス緩液)



G.S.G含有尿からの各種pHでの抽出ーアルカリ性尿の場合



G.S.G含有尿からの各種モル濃度での抽出ー酸性尿の場合  
(抽出緩衝液: pH9.0トリス緩液)



G.S.G含有尿からの各種pHでの抽出ー酸性尿の場合  
(抽出緩衝液: 10mMトリス緩液)

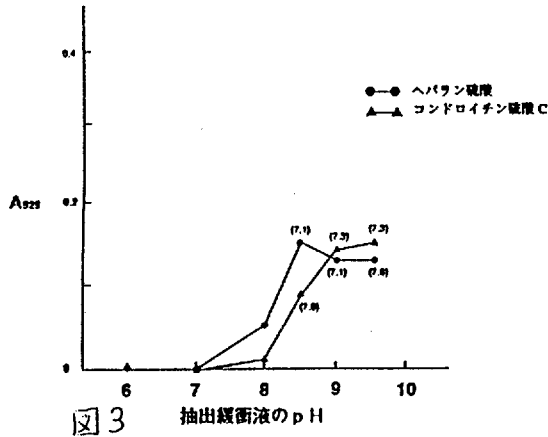


表 1 患者尿を用いた検討

正常対照	GSG/Cr (mg/g)	pH	GSG/Cr (mg/g)
1.	36	1. (I)	376
2.	52	2. (I)	318
3.	250	3. (II)	275
4.	217	4. (III B)	376
5.	23	5. (III C)	290
6.	100	6. (VI)	390



## 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マススクリーニングへ向けて、現行の神経芽細胞種のマススクリーニングに用いられている VMA327(東洋)濾紙にしまった尿検体からのグリコサミノグリカン(GSG)の抽出法の基礎的検討を行った。まず、各種の GSG の水溶液を濾紙にしませて乾燥後、蒸留水を用いて溶出したところ、ある程度の回収が得られたが、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、その回収は極めて悪かった。そこで、様々の抽出緩衝液の pH とモル濃度を検討したところ、酸性尿とアルカリ性尿ではその溶出態度に大きな開きがあり、アルカリ性尿の場合は比較的容易に抽出されるが、酸性尿では pH9.0 以上で 200-500mM のトリス蟻酸緩衝液ではじめて十分な抽出が可能であった。VMA327 濾紙をもちいてマススクリーニングを行う場合、GSG の溶出態度を十分にモニターする必要があると考えられた。