

ムコ多糖症マス・スクリーニング：自動分析法とマイクロプレート法の比較検討
(分担研究：新しいスクリーニングのあり方に関する研究)

岩田晶子*、国立三恵*、祐川和子*、折居忠夫*

要約 1,9-dimethylmethylene blue (DMB)を用いた簡易なムコ多糖定量法をマススクリーニング法としての実用化に向けて検討している。今回は、次の3項目について検討した。1) マイクロプレート法と、自動分析法を比較した。コンドロイチン6硫酸を標準物質とした標準曲線で、マイクロプレート法では300 $\mu\text{g/ml}$ まで直線性が得られた。また、マイクロプレート法と自動分析法の相関係数は、 $r=0.917$ と良好な結果が得られた。2) 尿ろ紙からの回収法を検討した結果、抽出法を吟味することでろ紙の選択範囲も広がることが明らかとなった。3) 岐阜県でのパイロットスタディ：19800人をスクリーニングしたが、現在までのところまだ患者はみつかっていない。

見出し語：ムコ多糖症、マス・スクリーニング

研究方法

1) 尿は、岐阜県で収集された神経芽細胞腫マススクリーニング検体のうち、インフォームドコンセントが得られた6か月児尿を使用した。

2) マイクロプレート法：5 μl 尿 (-20°C凍結保存) に 240 μl DMB試薬 (35 μM DMB, 50mM FORMATE BUFFER / 0.18M Tris pH 8.8) を加え MICRO PLATE

READER (520nm) で測定した。

3) ろ紙からの尿の抽出法：ろ紙に尿またはMPS/クレアチニン標準液を浸して一夜風乾する。エッペンチューブに破片ろ紙を入れ、0.4×2cmろ紙あたり300 μl の蒸留水又は、50mM FORMATE BUFFER / 0.18M Tris pH 8.8を加え室温で一時間放置後、vortexをかけて抽出し10000rpm 10分間の遠心上清をムコ多糖定量に供した。

岐阜大学小児科 (Dep.of Pediatrics,Gifu Univ)

(訂正：平成5年度報告書中のろ紙No.327をろ紙No.63に訂正します。)

4) 岐阜県でのパイロットスタディ：自動分析法(本誌3(2),145,1993参照)にてムコ多糖を定量した。

結果

1) マイクロプレート法

標準曲線(図1)：コンドロイチン6硫酸を標準物質とした標準曲線で、試料を20 μ l、10 μ l、5 μ lの3種類で比較したところ、試料を5 μ lにおさえると、300 μ g/mlまで直線性が得られた。

同時再現性(表1)：CV%は、1.1-7.3%と、比較的良い値が得られた。

自動分析法との相関(図2)：マイクロプレート法と自動分析法とで、ムコ多糖を測定し比較した。n=60 r=0.917と良好な結果が得られた。しかし測定値はマイクロプレート法のほうが、高い値にでる傾向が認められた。

	試料 1		試料 2		試料 3	
	-	+	-	+	-	+
遠心操作	-	+	-	+	-	+
n	10	10	10	10	10	10
平均(μ g/ml)	60.3	58.9	94.7	99.9	175.1	177.9
標準偏差	0.7	1.3	4.3	7.2	3.5	5.9
CV%	1.1	2.3	4.6	7.3	2.0	3.3

表1 同時再現性(マイクロプレート法)

2) ろ紙法：

原尿とろ紙尿の比較(表2)：リントーパルプ製のろ紙からは水抽出で充分回収され、原尿との相関係数も高かったが、木材パルプ製では水抽出での回収は悪く、アルカリ液での抽出が必要であった。木材パルプ製では補強剤としてポリアミド系補強剤が含まれており、それによりMPSがトラップされるためと考えられる。

コンドロイチン6硫酸

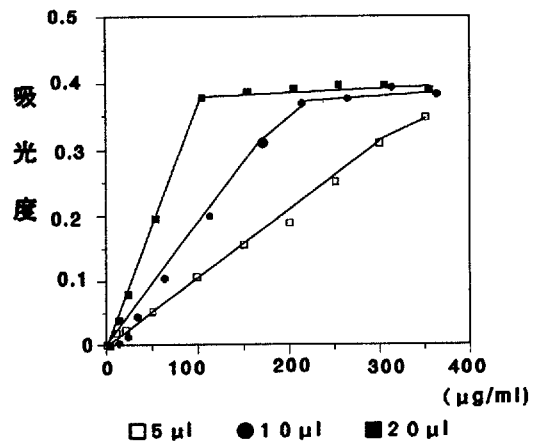


図1 標準曲線

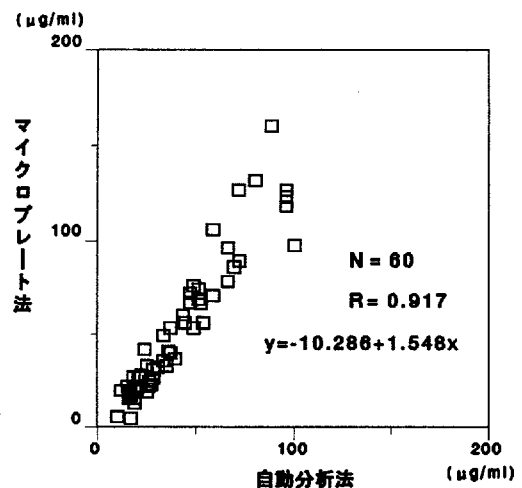


図2 自動分析法、マイクロプレート法の相関

ろ紙	N	MPS		クレアチニン	
		回収 (%)	相関係数	回収 (%)	相関係数
リントーバルブ製					
No.63 (水抽出)	50	105±29	0.92	104±17	0.97
血液ろ紙 (")	50	106±24	0.98	108±21	0.98
No.2 (")	50	116±30	0.93	105±26	0.98
ペーパーディスク (")	50	111±28	0.97	103±26	0.95
3MM (")	50	108±25	0.95	119±24	0.97
木材バルブ製					
No.327 (水抽出)	50	39±12	—	104±19	0.98
No.424 (")	50	14±19	—	116±21	0.97
No.327 (アルカリ液抽出)	50	99±28	0.95	97±14	0.98
No.424 (")	50	88±21	0.92	101±12	0.98

表2 原尿とろ紙尿との比較
(ろ紙からの回収率と原尿法との相関係数)

3)岐阜県でのパイロットスタディ(表3):
6か月乳児尿にてDMB法によるマススクリーニングのパイロットスタディを施行した。19800人を一次スクリーニングし、要再検査数は467人(2.4%)であった。この内367人(再採尿率 79%)に二次スクリーニングを行ったところ要再々検査数は13人であった(3.5%)。三次スクリーニングとしてウロン酸測定によるムコ多糖定量と電気泳動による亜型診断を試みたが、陽性例は、認められなかった。

考察

マススクリーニングは、多量の検体を処理する必要があるため、検査方法は簡便で、速いことが望ましい。その点、マイクロプレート法は、マススクリーニングに適した検査であるといえる。しかし、今回の自動分析法との比較において、マイクロプレート法の測定値の方が高い値にでた。その原

因の一つとして、自動分析法はサンプルブランクをとり、混濁尿などによる測定値の影響を取り除いているが、マイクロプレート法ではその補正を行っていないことが考えられる。今後、この点についてのさらなる検討が必要と思われる

尿ろ紙からのムコ多糖の定量は、抽出方法を吟味することで、ろ紙の選択範囲も広いことが明らかである。今回7種類のろ紙について検討したが、いずれも高い回収率が得られた。今後もDMB法を用いた精度、有効性の高いマススクリーニングを開発するために、さらにパイロットスタディを進めつつ改良を加えていきたいと考える。

一次スクリーニング総数	19800人
要再検査数	467人 (2.4%)
二次スクリーニング総数	367人 <small>再採尿率</small>
要再検査数	13人 (3.5%)
三次スクリーニング総数	13人
陽性例	0

表3 岐阜県でのムコ多糖症パイロットスタディ
(1993.10 - 1994.12)



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 1,9-dimethylmethylene blue(DMB)を用いた簡易なムコ多糖定量法をマススクリーニング法としての実用化に向けて検討している。今回は、次の3項目について検討した。1)マイクロプレート法と、自動分析法を比較した。コンドロイチン6硫酸を標準物質とした標準曲線で、マイクロプレート法では300 µg/mlまで直線性が得られた。また、マイクロプレート法と自動分析法の相関係数は、 $r=0.917$ と良好な結果が得られた。2)尿ろ紙からの回収法を検討した結果、抽出法を吟味することで紙の選択範囲も広がることが明らかとなった。3)岐阜県でのパイロットスタディ:19800人をスクリーニングしたが、現在までのところまだ患者はみつからない。