

尿ろ紙を用いた先天性ムコ多糖症のスクリーニング第2報：
マイクロプレート法の精度管理について
(分担研究： マス・スクリーニング対象疾患に関する研究)

田中あけみ*、長谷川佳代*、藤本昭栄**、堀江浩子*、
一色 玄*、松本 進***、武井節子***

要約

ムコ多糖症スクリーニングのための「マイクロプレート法」について、測定精度と安定性を検討した。ムコ多糖の標準品としては、コンドロイチン硫酸C (Ch-C) (生化学工業)を用い、平底96穴マイクロプレート (スミロン) 上でジメチルメチレンブルー (DMB) (Aldrich) と反応させ、525nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (コロナMTP-32) で測定した。

Ch-Cの20~320 μ g/mlの濃度において、CV値は常に1桁であり、また、吸光度は、Ch-Cの濃度に比例して直線的であった。したがって、ピペット誤差、プレート誤差、測定誤差は、ほとんど無いと考えられた。

Ch-Cを、0.18Mトリスギ酸バッファーpH8.8中またはプール尿中に溶解したものの一定量をろ紙にスポットし、ここから1/4インチのパンチ4枚をとって0.3mlの0.18Mトリスギ酸バッファーpH8.8にいれ、65°Cで60分間の超音波処理をおこなった。このときのCh-Cの添加回収率は、常に70%前後で安定しており、また、バッファーに溶解した場合と尿に溶解した場合との間に差が無かった。さらに、測定値は、添加した溶液の濃度に比例して直線的で、CVも小さく、液のまま測定する場合と同様の精度で測定できた。

DMBの濃度は、26 μ Mが適当であった。また、DMBストック液 (350 μ M)、Ch-C標準液とも3週間で劣化を示した。

見出し語： 先天性ムコ多糖症、尿ろ紙、マス・スクリーニング、ジメチルメチレンブルー、
マイクロプレート

1、研究方法

[1] 標準液の調整

標準液は、コンドロイチン硫酸C (Ch-C) (生化学工業) を0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH 8.8または2歳以下の小児のプール尿に、20~320 μ g/mlの濃度に溶解して作成した。

ろ紙は、東洋ろ紙327番を用いた。

標準ろ紙検体は、このろ紙に直径16.5mmの円を描き、その中心点に標準液の60 μ lを滴下して染み込ませ乾かしたのち、この部分より、1/4インチのパンチでろ紙片を4枚打ち抜いて得た。

[2] 測定法、抽出法

発色試薬は、ジメチルメチレンブルー (DMB) (Aldrich) を0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH 8.8に適当な濃度に溶解して調整した。DMBは、最初、少量のエタノールに完全に溶解したのちバッファーを加えて350 μ M濃度とし、ストック液とした。これを使用事にバッファーで適当に希釈した。

反応は、96穴マイクロプレート (スミロン) 上で、標準液の10 μ lまたはろ紙からの抽出液の50 μ lに、希釈したDMB試薬240 μ lを加えて呈色させた。

測定は、コロナMTP-32マイクロプレートリーダーで、波長525nmの吸光度を求めることにより行った。発色試薬を入れ、直ちにプレートミキサーで数秒間振とうさせたのち、すぐに吸光度を測定した。

ピペット操作は、すべて8連結のマルチチャンネルピペットで行った。

ろ紙からのムコ多糖の抽出は、前年度の報告のとおり、0.3mlの0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH 8.8中で60℃で60分間超音波処理を行うことによった。

[3] ピペット誤差、プレート誤差、測定誤差

同じ検体をプレートの96穴すべてに入れ、DMBで発色させ、その吸光度の値についてCVを求めた。また、様々の標準検体について、測定値のCVを求めた。

[4] 試薬の劣化

DMBストック液、Ch-C標準液のそれぞれを、3週間前に作成したものと、測定当日に作成したものとについて、測定値を比較した。

2、結果

どのプレートにおいても、またプレート間においても、CVは常に1.5前後であり、ピペット誤差、プレート誤差はほとんど無かった。

Ch-Cの各濃度におけるCVは、表1に示したとおりである。溶液であってろ紙抽出液であっても、また、トリス・蟻酸バッファーに溶解した場合でもプール尿に溶解した場合でも、すべてにおいてCVは十分に小さかった。

Ch-Cをトリス・蟻酸バッファーに溶解した場合でもプール尿に溶解した場合でも、吸光度の値はほぼ等しく、Ch-Cの濃度に比例し、図1に示す様な直線を示した。

ろ紙からのCh-Cの添加回収率は、表2に示したとおりほぼ一定で70%前後であった。さらに、ろ紙より回収したCh-Cの測定値は、トリス・蟻酸バッファーに溶解した場合でもプール尿に溶解した場合でも、吸光度はほぼ等しく、Ch-Cの濃度に比例し、図2のような直線が得られた。

DMBストック液、Ch-C標準液のそれぞれを、3週間前に作成したものと、測定当日に作成したものとについて、測定値を比較したところ、その吸

光度の値は、当日調整DMBストック液・当日調整Ch-C標準液>当日調整DMBストック液・3週間前調整Ch-C標準液>3週間前調整DMBストック液・当日調整Ch-C標準液となった。

さらに、DMBストック液を0.18Mトリス・蟻酸

バッファーpH 8.8で10倍に希釈して35 μ Mとしたものを用いて測定した場合と、これを3/4倍(26 μ M)、2/3倍(23 μ M)、1/2倍(17 μ M)にさらに希釈して用いた場合とを比較したところ、3/4倍(26 μ M)のときが最も直線性に優れていた。

表1 コンドロイチン硫酸Cの濃度とCV値

コンドロイチン硫酸C(μ g/ml)	溶液		ろ紙	
	バッファーに溶解	7-ル尿に溶解	バッファーに溶解	7-ル尿に溶解
20	8.16	5.56		
40	5.17	4.95	2.15	5.89
80	7.56	6.22	1.39	5.12
160	1.37	3.07	2.35	3.92
240	1.42	2.11	3.38	3.00
320			1.55	5.10

表2 添加回収率

コンドロイチン硫酸C(μ g/ml)	バッファーに溶解(%)	7-ル尿に溶解(%)
20	64.4	75.3
40	75.0	77.4
80	70.8	79.7
160	64.1	64.1

図1 コンドロイチン硫酸Cの濃度と吸光度

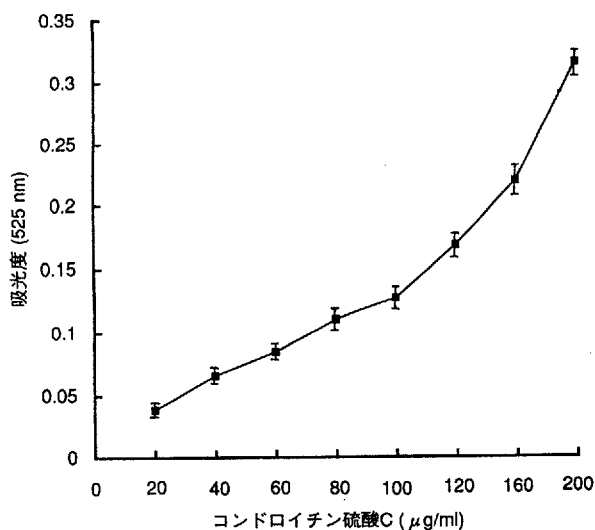
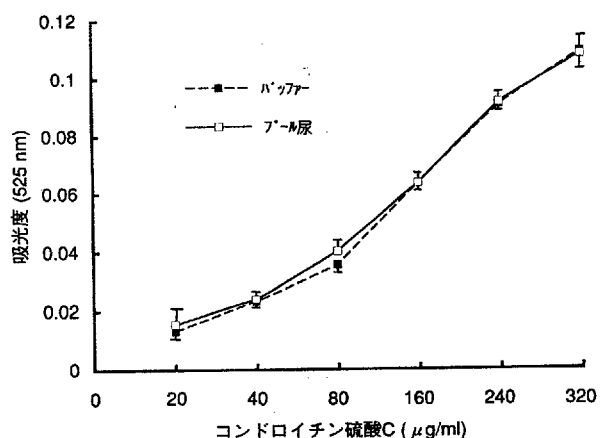


図2 ろ紙より抽出したコンドロイチン硫酸C



3、考察

先天性ムコ多糖症について、骨髄移植などの治療の可能性や、次子の発症を防ぐという面から、早期発見の必要性が言われている。

私達は、昨年度より、DMBによるムコ多糖の呈色反応をマイクロプレートを用いて吸光度を測定する「マイクロプレート法」を提案し、検討してきた。この方法は、簡便であり多数の検体を測定するのに有用であるうえ、定量性にも優れている。

また、検体としては、現在、大阪市で神経芽細胞種のスクリーニングに用いられている尿ろ紙を用いることとした。尿ろ紙は、原尿に比べ抽出操作が必要であるが、運搬性や保存性に優れている。

この「マイクロプレート法」を用いて全国的なスクリーニングを始めるにあたっては、どの施設においても同様の安定した結果が得られなければいけない。そこで、今回は、測定値の精度、再現性、安定性について検討した。

結果に示したように、抽出操作も含め、測定値にバラつきはほとんどなく、十分に小さいCV値が得られた。さらに、吸光度は、Ch-Cの濃度に比例して良好な直線的増加を示し、且つ再現性も良好であった。これらのことから、「マイクロプレート法」は、どの施設で行っても、安定した結果が得られることが期待される。

試薬類については、DMBストック液もCh-C標準液もおよそ3週間で明らかな劣化が認められた。そこで、DMBストック液もCh-C標準液も10日間で廃棄することと決めた。また、前年度の報告による検量線は、 $35\mu\text{M}$ のDMBを用いて求めたが、常に新しく試薬を調整した場合、むしろ $26\mu\text{M}$ の方が良好な直線性が得られた。前年度の報告では、試薬の劣化があったのではないかと推測された。

4、文献

1. Whitley CB et al., Clin Chem 35: 2074-2081 (1989)
2. Jong JGN et al. Clin Chem 38: 803-807 (1992)

ABSTRACT

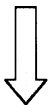
SCREENING OF MUCOPOLYSACCHARIDOSES WITH URINE SAMPLES COLLECTED ON A PAPER MATRIX BY DMB-TRIS ASSAY IN A 96-WELL MICROPLATE

Akemi Tanaka, Kayo Hasegawa, Akie Fujimoto, Hiroko Horie, Gen Isshiki, Setsuko Takei and Susumu Matsumoto

Screening method for mucopolysaccharidoses with urine samples collected on a paper matrix by DMB (dimethylmethylene blue)-Tris assay in a 96-well microplate was studied. Four pieces of 1/4 inch punch were collected for one sample from the urine blotted filter papers and the glycosaminoglycans were extracted in 0.3 ml of 0.18M Tris-formate buffer, pH 8.8 by sonicating at 60 Hz, 65°C for 60 min. Ten microliters of standard solutions of chondroitin sulfate type C (Ch-C) dissolved in a pooled urine in concentrations of 20-320 $\mu\text{g/ml}$ or 50 μl of extracts from the filter papers were used for the assay. Each sample was applied on wells of 96-well plates and 240 μl of 26 μM DMB in 0.18M Tris-formate buffer, pH 8.8 were added to the wells, then the absorbances of 525 nm wave length were measured by microplate reader (Corona MTP-32). A linear increasing of the absorbance was observed in proportion to the concentrations of Ch-C up to 200 $\mu\text{g/ml}$. Moreover, CV of the absorbances measured showed satisfactorily low values.

In conclusion, this DMB-Microplate Assay method is very useful for the screening of mucopolysaccharidoses because of the simplicity and the reliability.

*大阪市立大学医学部小児科、**大阪市環境保健協会、***大阪市環境保健局保健衛生検査所



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

ムコ多糖症スクリーニングのための「マイクロプレート法」について、測定の精度と安定性を検討した。ムコ多糖の標準品としては、コンドロイチン硫酸 C(Ch-C)(生化学工業)を用い、平底 96 穴マイクロプレート(スミロン)上でジメチルメチレンブルー(DMB)(Aldrich)と反応させ、525nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(コロナ MTP-32)で測定した。

Ch-C の 20 ~ 320 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、CV 値は常に 1 桁であり、また、吸光度は、Ch-C の濃度に比例して直線的であった。したがって、ピペット誤差、プレート誤差、測定誤差は、ほとんど無いと考えられた。

Ch-C を、0.18M トリス塩酸バッファー pH8.8 中またはプール尿中に溶解したものの一定量をろ紙にスポットし、ここから 1/4 インチのパンチ 4 枚をとって 0.3ml の 0.18M トリス塩酸バッファー pH8.8 に入れ、65 °C で 60 分間の超音波処理をおこなった。このときの Ch-C の添加回収率は、常に 70%前後で安定しており、また、バッファーに溶解した場合と尿に溶解した場合との間に差が無かった。さらに、測定値は、添加した溶液の濃度に比例して直線的で、CV も小さく、液のまま測定する場合と同様の精度で測定できた。

DMB の濃度は、26 μM が適当であった。また、DMB ストック液(350 μM)、Ch-C 標準液とも 3 週間で劣化を示した。