

尿濾紙を用いたムコ多糖症スクリーニングの検討
(分担研究：スクリーニングの新しい対象疾患に関する研究)

鈴木義之, 桜庭 均, 加瀬良一,
斎藤貴子, 大竹 明, 高柳正樹*

要約 尿濾紙を試料に用いて、1, 9-Dimethylmethylen Blue (DMB) 法によるムコ多糖症のスクリーニングを行うための条件検討を行った。市販の16種類の濾紙を用いて、通常の水抽出によって濾紙からのムコ多糖の回収率を調べた所、Whatman No.540をはじめ14種類の濾紙に関して良好な結果が得られた。残りの2種類のうち、東洋濾紙No.327については、現在神経芽細胞腫マス・スクリーニングに使用されている。そこで、両疾患のマス・スクリーニングに共用できる利点を考え、アルカリ液抽出によるムコ多糖の回収率向上を試みた。その結果、良い回収率が得られ、この濾紙も分析に使用できるものと考えられた。今回は、抽出が容易で紙質が強靱なWhatman No.540を用いて、既知のムコ多糖症患者5例並びに各年齢に渡る156例の対照者の尿中ムコ多糖の検出を行った。両者間で比較的是っきりとした差異が認められ、尿濾紙によるマス・スクリーニングは可能と思われた。

見出し語 ムコ多糖症, 尿濾紙, 1, 9-Dimethylmethylen Blue

東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学研究部門, 千葉県こども病院代謝科*

(Department of Clinical Genetics, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, *Division of Metabolism, Chiba Children's Hospital)

研究方法

1) 尿検体

既知のムコ多糖症患者5例(いずれも男性)と156例の対照者(男性83例、女性73例;年齢は出生直後より15歳まで)由来の尿を試料とした。ムコ多糖症患者は、Hurler症候群1例(24歳)とHunter症候群4例(8歳2例、9歳1例、11歳1例)を含む。

2) 尿中ムコ多糖の定量

a) 尿を試料とした直接法によるムコ多糖の測定

原尿を1,500×g、30分間遠心し、その上清を試料とした。20μlの試料に480μlの水を加え、105μMの1, 9-Dimethylmethylene Blue (DMB, Aldrich Chem. Co.)を含む0.18M Tris-50mM formate buffer (pH 8.8)を250μl加えて発色させ、525nmで吸光度を測定した。標準液には、コンドロイチン6硫酸(生化学工業)を水または正常者由来の尿に溶解したものを用いた。

b) 尿濾紙を試料としたムコ多糖の測定

2×3cmの濾紙片に250μlの試料を浸み込ませ、一晚室温で乾燥させた。尿濾紙を細切した後、1mlの水を加えて4℃で18時間処理することにより、ムコ多糖を抽出した。また、東洋濾紙No.327の場合には、1mlの0.18 M Tris-50 mM formate buffer (pH8.8)を加えて4℃、18時間処理によりムコ多糖を抽出し、水処理の場合と比較した。抽出処理後に7,000×g、10分間遠心し、その上清20μlを取り、直接法と同

様の手技により試料中のムコ多糖を測定した。

3) 尿中クレアチニンの定量

尿濾紙から、上記の方法で水抽出を行い、Whitleyらの方法¹⁾に従ってクレアチニンを測定した。

結果と考察

標準物質を浸み込ませた各種の濾紙を用いて、水抽出を行った場合のムコ多糖及びクレアチニンの抽出効率の比較を示した(表)。Whatmann 3MM (Whitleyら²⁾は、これを用いてムコ多糖症のスクリーニングの可能性について報告している)を用いた場合の抽出効率を100%とした場合、ムコ多糖に関しては、Whatman No.1, 3, 4, 5, 41, 42, 43, 52, 540, 541, 542並びに東洋濾紙No.2, 526で89から110%と良い値が得られた。一方、Whatman No.113と東洋濾紙No.327では、それぞれ42%、10%と低い値が得られた。これらの濾紙の抽出効率が高いのは、ポリアミド系補強剤がムコ多糖をトラップするためと考えられた。一方、クレアチニンに関しては、いずれの濾紙でも良い抽出効率を示した。

東洋濾紙No.327については、この濾紙が神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに広く使用されているため、将来の共用の可能性を考え、ムコ多糖の抽出法を検討した。その結果、アルカリ抽出により良好な抽出が得られ、この方法を用いればムコ多糖検出に使用可と考えられた(図1)。

今回、検討した濾紙の中から、水抽出ができ、

強靱で使い易いWhatman No.540を選んで、正常者由来の尿に加えた標準物質の定量を、直接法と濾紙法とで比較した所、標準物質濃度600 $\mu\text{g/ml}$ に至るまで、直線性が得られた(図2)。

Whatman No.540を用いた尿濾紙法で、各年齢層の対照者及びムコ多糖症患者のムコ多糖/クレアチニン(GAG/Cr)値を検討した(図3)。対照者の値は1歳以後はほぼ安定し、いずれも150mg GAG/g Cr以下であった。一方、ムコ多糖症患者では、いずれも200mg GAG/g Cr以上の値を示し、両者の判別が可能であった。6ヶ月児の値は、年長者のそれに比べて広い範囲に渡った。疾患の早期発見、治療や検診時の試料の採取などを考えると、6ヶ月時でのスクリーニングの利点が多いことから、さらに検体数を増やしてこの年齢の児の尿の検討が必要と思われる。また、今回の検討では、6ヶ月未満の児での値が低かったが、これは単に検体数が少ないことを反映していると考えられ、他の報告の結果を考え併せると、この年齢層での腎の未熟性から、かなり広い幅の値を示すことが予想され、マス・スクリーニングには不適と思われる。

文献

- 1) Whitley, C.B., et al.: Clin. Chem. 35:374-379, 1989.
- 2) Whitley, C.B., et al.: Clin. Chem. 35:2074-2081, 1989.

表

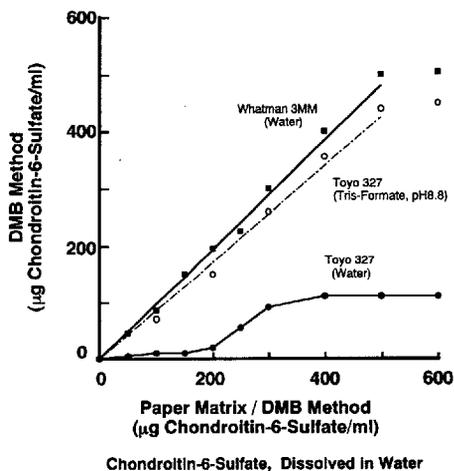
Comparison of Extraction Efficiency from Paper Matrices

	Extraction Efficiency(%)		Quality
	Glycosaminoglycan	Creatinine	
Whatman 3MM	100	100	Chromatography
1	96	102	Qualitative
3	100	110	
4	96	98	
5	101	102	
41	93	105	Ashless
42	110	111	
43	100	103	
52	97	107	Hardened
113	42	105	Wet Strengthened
540	100	105	Hardened Ashless
541	93	108	
542	94	111	
Toyo 2	100	105	Qualitative
327	10	104	Industrial
526	89	93	Chromatography

Extraction Efficiency (200 μg Chondroitin-6-Sulfate / ml)

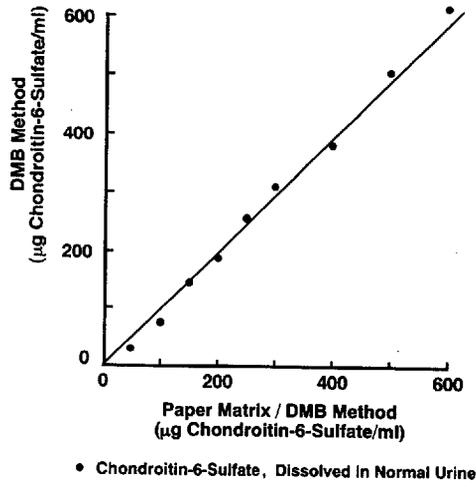
図1

Linear Range of Paper Matrix / DMB Method (Toyo 327 and Whatman 3MM)



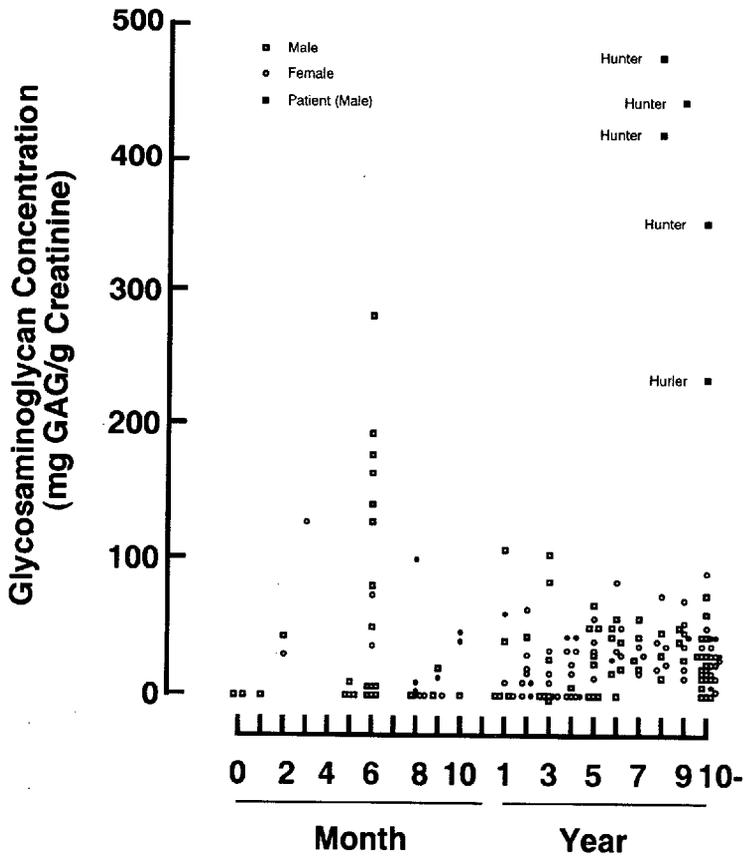
☒ 2

Comparison of Paper Matrix / DMB Method (Whatman 540) with Standard DMB Method



☒ 3

Glycosaminoglycan Concentration in Reference Urine Samples Measured by Paper Matrix/DMB Method (Whatman 540)





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 尿濾紙を試料に用いて、1,9-Dimethylmethylen Blue(DMB)法によるムコ多糖症のスクリーニングを行うための条件検討を行った。市販の 16 種類の濾紙を用いて、通常の水抽出によって濾紙からのムコ多糖の回収率を調べた所、Whatman No.540 をはじめ 14 種類の濾紙に関して良好な結果が得られた。残りの 2 種類のうち、東洋濾紙 No.327 については、現在神経芽細胞腫マス・スクリーニングに使用されている。そこで、両疾患のマス・スクリーニングに共用できる利点を考え、アルカリ液抽出によるムコ多糖の回収率向上を試みた。その結果、良い回収率が得られ、この濾紙も分析に使用できるものと考えられた。今回は、抽出が容易で紙質が強靱な Whatman No.540 を用いて、既知のムコ多糖症患者 5 例並びに各年齢に渡る 156 例の対照者の尿中ムコ多糖の検出を行った。両者間で比較的是っきりとした差異が認められ、尿濾紙によるマス・スクリーニングは可能と思われた。