

ムコ多糖症の尿ろ紙を用いたマス・スクリーニング
ーパイロットスタディーー

(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¹⁾、白石廣行²⁾、成澤邦明¹⁾

<要約>

ムコ多糖症マス・スクリーニングへ向けて、現行の神経芽細胞種のマス・スクリーニング用尿ろ紙1098枚を用いてパイロットスタディーを行った。神経芽細胞腫の検査済み尿ろ紙の利用については、保護者に主旨説明書と同意書用紙を配布し書面によるインフォームドコンセントを得られた検体(平成7年年末現在で6カ月児265枚、1才6カ月児833枚)を対象として検索を行った。ムコ多糖の抽出条件は昨年度の検討を基に200mMのトリス蟻酸緩衝液(pH9.0)で60度で1時間の処理とした。酸性ムコ多糖の測定はDMB法、クレアチニンの測定にはピクリン酸法を用いた。結果をムコ多糖(mg)/クレアチニン(g)で表すと6カ月児の平均232.0、標準偏差194.6、1歳6カ月児の平均175.3、標準偏差176.6であった。今回の結果に十分数の同年齢患者尿の結果を加えることによりカットオフ値設定の検討が可能であると考えられた。

<見出し語>

尿ろ紙、アルカリ抽出法、DMB法、パイロットスタディー

東北大学医学部病態代謝¹⁾(Department of Bichemical Genetics, Tohoku University School of Medicine)、宮城県保健環境センター²⁾

<研究方法>

1. 尿ろ紙検体：宮城県で行われている神経芽細胞腫マスキリングの検査済み尿ろ紙を検索標品とした。この利用にかんしては、保護者に主旨説明書と同意書用紙を配布し書面（図1参照）によるインフォームドコンセントを得られた検体（95年12月現在で6カ月児265検体1才6カ月児833検体）を対照として検索を行った。

2. ムコ多糖の抽出法（図2参照）：3個の6mm径の濾紙円盤をパンチし、96穴マイクロプレートの各ウエルに入れる。200ulの200mMトリス蟻酸緩衝液(pH9.0)を注入した後、60度で1時間の加熱処理を行った。96穴プレート用遠心機で遠心後、上清約70ulを新しいプレートへ移し、ムコ多糖及びクレアチニンの濃度測定に供した。

3. DMB法によるグリコサミノグリカンの定量（図2参照）：Whitleyらの原法（文献参照）をもとに35uM1,9-Dimethylmethylene blue, 200mM Tris-50mM formate buffer (pH9.0) 溶液200ulを96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに分注後に尿の抽出検体30ulを加えて直ちに混和後、マイクロプレートリーダー（BioRad, Model450）にて吸光度を測定した。コンドロイチン6硫酸の標品の水溶液を用いて検量線を作成し抽出液中のグリコサミノグリカン濃度を求めた。

4. クレアチニン定量（図2参照）：96穴プレートの各ウエルへ22mMピクリン酸ナトリウム溶液53.3ul、0.75N水酸化ナトリウム溶液53.3ul、H₂O93.3ulをあらかじめ分注しておいたものに抽出上清20ulを加えて室温で20分間放置。その後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。標準クレアチニン溶液を用いて検量線を作成し、抽出液中のクレアチニン濃度を求めた。

5. 3と4の結果から各検体の結果をグリコサミノグリカン(mg)/クレアチニン(g)で表し評価を加えた。

<結果>

1) 宮城県で行われている神経芽細胞腫のマスキリングは6カ月児と1才6カ月児を対象におこなわれており、尿ろ紙の配布などは各市町村の保健所が窓

口になっている。今回のパイロットスタディー実施のためにこれら関係諸機関に協力を依頼し、2カ月間本研究の説明書と同意書用紙の配布をお願いしたところ約70%の保護者から書面によるインフォームドコンセントを得ることができた。このうち今回、6カ月児265検体、1才6カ月児833検体を使用して検索を行った。

2) 6カ月児の尿ろ紙の結果は、平均232.0(mg/g)、標準偏差194.6で、一方、1歳6カ月児は、平均175.3、標準偏差176.6であった。6カ月児の検体の分布を図3に、1歳6カ月児の検体の分布を図4に示す。6カ月児、1歳6カ月児共に1000mg/gを超えるような検体が見受けられた。

<考案>

今回は簡便性を考慮し、微量遠心チューブを使用せずマイクロタイタープレートを用いた方法ですべての行程を行った。最も労力を要する過程は尿ろ紙の3個のパンチ片を96穴プレートの各ウエルへ入れていく行程でありこの部分の自動化は飛躍的に能率が向上するものと推察された。この他の過程はマルチチャンネルピペッターの使用などでかなり能率的に進める事ができた。

抽出法に関しては昨年度の検討を踏まえ今回は200mMトリス蟻酸(pH9.0)での抽出を行った。この抽出溶液がムコ多糖及びクレアチニンの検出系に影響を及ぼすことはなかった。

6カ月児、1歳6カ月児の検体の中には比が1000を超えるような検体が含まれていた。現在、これらの検体の再検討を進めているがクレアチニン濃度の低い薄い尿の検体でMPS/Cre比が高く出る傾向があり今後の検討課題と考えられた。

<文献>

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.

図1

ムコ多糖症マスキリング法の
確立へ向けての御協力をお願い

ムコ多糖症は、3才頃から骨が変形して背が伸びない先天性の病気です。この病気が早期に発見して治療や訓練をする事が大切であることが、最近分かってきました。この病気を早く見つけるために、尿を用いた検査法が検討され早期発見の可能性が出てきました。

現在、宮城県では6ヵ月児と1歳6ヵ月児を対象に、尿を染み込ませた検査用のろ紙を用いて神経芽細胞腫の検査が行われています。そこで、今回お送り頂く検査用ろ紙を神経芽細胞腫の検査終了後、ムコ多糖症の検査法の検討のためにも使用させて頂きたいと存じます。尚、この検査のために新たに尿をお取り頂く必要はありませんし、費用もかかりません。

つきましては、検査の実施にご承諾頂ける場合は、右の同意書に記入、捺印の上、神経芽細胞腫検査用のろ紙の御返送の際、同封して下さい。

検査のご承諾を戴いた尿ろ紙は平成8年1月上旬にまとめて検査を実施する予定です。検査の結果、再検査の必要がある場合は、こちらから御連絡をさせて頂く場合がありますので、あらかじめ御了承下さい。

厚生省心身障害研究

「ムコ多糖症マスキリング」研究班
東邦大学医学部第二小児科 青木健雄
東北大学医学部病態代謝 成澤邦明

図2

同 意 書

今回お送りいただく検査用ろ紙をムコ多糖症の検査にも使用する事を同意致します。

平成 年 月 日

保護者現住所

電話番号

保護者氏名

印

お子さんの氏名

方 法

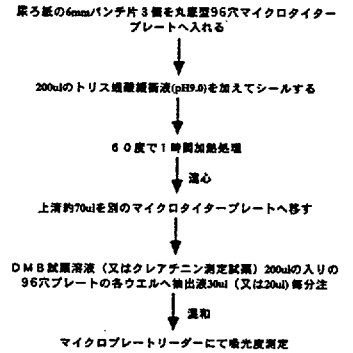


図3 6ヵ月児
(n = 265)

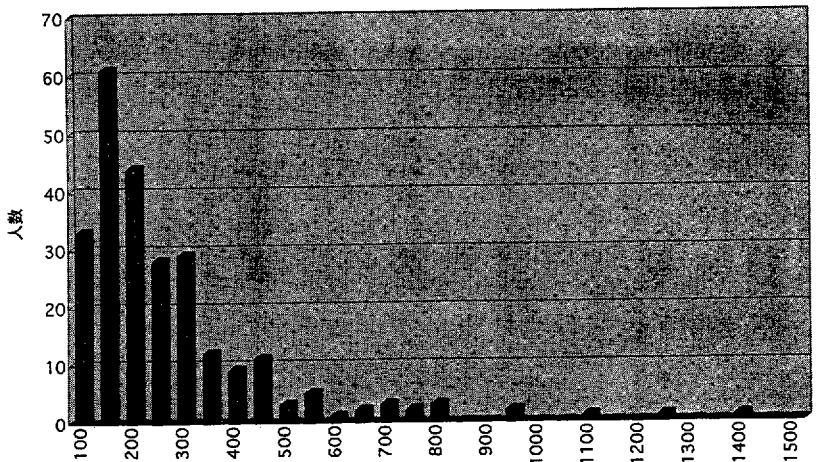
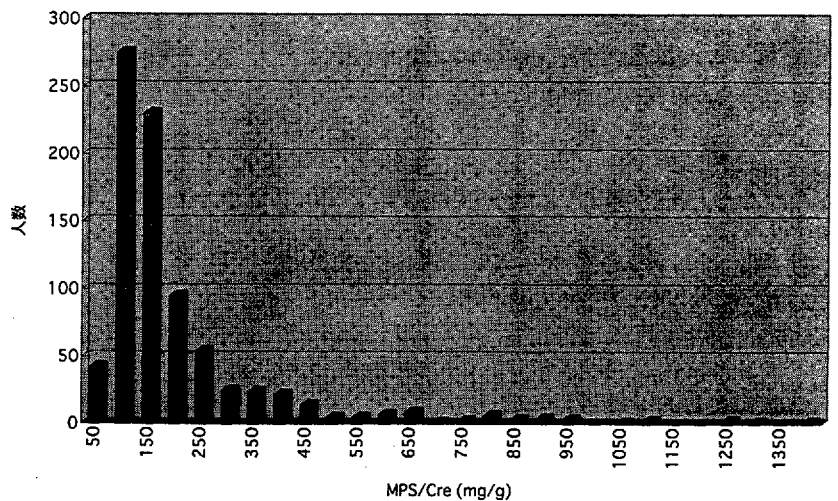


図4 1歳6ヵ月児
(n = 833)





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・スクリーニング用尿ろ紙 1098 枚を用いてパイロットスタディーを行った。神経芽細胞腫の検査済み尿ろ紙の利用については、保護者に主旨説明書と同意書用紙を配布し書面によるインフォームドコンセントを得られた検体(平成7年年末現在で6カ月児265枚、1才6カ月児833枚)を対象として検索を行った。ムコ多糖の抽出条件は昨年度の検討を基に200mMのトリス蟻酸緩衝液(pH9.0)で60度で1時間の処理とした。酸性ムコ多糖の測定はDMB法、クレアチニンの測定にはピクリン酸法を用いた。結果をムコ多糖(mg)/クレアチニン(g)で表すと6カ月児の平均232.0、標準偏差194.6、1歳6カ月児の平均175.3、標準偏差176.6であった。今回の結果に十分数の同年齢患者尿の結果を加えることによりカットオフ値設定の検討が可能であると考えられた。