

尿ろ紙を用いた先天性ムコ多糖症のスクリーニング：

デルマトン硫酸・ヘパラン硫酸の特異的検出

(分担研究：マスキング対象疾患一次スクリーニングから二次スクリーニングのあり方に関する研究)

田中あけみ¹、梶田知子¹、藤本昭栄²、新宅治夫¹、一色玄¹

要約

我々は、従来より、尿ろ紙を検体として、ジメチルメチレンブルーの呈色反応により、先天性ムコ多糖症のスクリーニングを行なって来た。しかし、この反応は、ほぼ全てのムコ多糖と反応するため偽陽性者が多く、精検に多くの手間と費用を必要とする。正常者で陽性となるものは、ほとんどがコンドロイチン硫酸A/Cの増加によるものであり、これに対し、患者ではデルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が増加している。そこで、陽性者のなかからコンドロイチン硫酸A/C以外のムコ多糖が増加しているものを抽出するため、コンドロイチナーゼAC消化を行なった。すなわち、1次スクリーニングで陽性となった検体は、コンドロイチナーゼAC消化処理をしたのちジメチルメチレンブルーの呈色反応を行ない、値が正常値まで低下したものを精検より除外した。この方法で、1カ月健診の乳児を対象にスクリーニングを行なった。その結果、精検率は、2.63%から0.53%に低下した。これより、コンドロイチナーゼAC消化による2次スクリーニングを行なうことによって、より効率的にスクリーニングを行なうことができると考えられた。

他方、ムコ多糖症IV型やVII型の一部では、異常ムコ多糖の排泄量が比較的少ないことから、ジメチルメチレンブルーの呈色反応で見逃されると考えられる。ムコ多糖症スクリーニングの目的は、(1) 早期発見により骨髄移植などの治療効果をあげる、(2) 遺伝相談を行なって、家族内再発(同胞や近親者における患児の出生)を防ぐ、ということが考えられる。(1)については、ムコ多糖症I型、VI型で特に効果が期待でき、II型、IV型の一部でも期待される。(2)の効果については、(1)の効果が期待できないような、II型の一部やIII型にとって重要であると考えられる。特にII型は日本人に多く、ムコ多糖症患者全体の約半分を占めているうえ、伴性劣性遺伝形式をとるため、考慮が必要である。日本における各病型の患者頻度とそれに対するスクリーニングによる発見率および早期治療の効果度を推定してみると、約8割以上の患者をこのスクリーニングにより発見でき、そのうちの半分の患者がスクリーニングによって治療の恩恵を

1) 大阪市立大学小児科、2) 大阪市環境保健協会

受け得ると考察された。

見出し語：先天性ムコ多糖症、スクリーニング、ジメチルメチレンブルー、コンドロイチナーゼAC

研究方法

【コンドロイチナーゼAC消化の検討】コンドロイチン硫酸A/C 200mg/dl、コンドロイチン硫酸A/C 100mg/dl + デルマトン硫酸 100mg/dl、デルマトン硫酸 200mg/dlの3種類の標準液をろ紙に染ませて3/16インチパンチ6枚を1検体として、コンドロイチナーゼAC消化による変化をみた。すなわち、0.4M-酢酸バッファーpH6.0の100 μ l中に、コンドロイチナーゼACが40mUおよび400mU含まれる溶液各々に、ろ紙検体を浸して37 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させて消化し、その後、以下の1次スクリーニングに述べたと同じ方法でムコ多糖を抽出して測定した。また、実際の患者の尿と正常者の尿とを用いて同様の処理をし、検討した。

【研究対象】大阪市立大学附属病院新生児室で出生した乳児の月齢1カ月児を対象とした。まず、新生児病棟を退院時に、検査の説明をしてろ紙を手渡し、1カ月健診のときに、このろ紙に児の尿を染み込ませて小児科外来まで持ってきてもらった。

【1次スクリーニング】従来より行なっている方法で1次スクリーニングを施行した。

抽出：尿ろ紙の3/16インチパンチ6枚をSMTラックセット（三光純薬）に入れ、0.3mlの0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH8.8に浸し、室温に48時間放置してムコ多糖を抽出した。

測定：ムコ多糖は、96穴平底マイクロタイタープレートに、抽出液50 μ lと48 μ Mジメチルメチレ

ンブルー（DMB）/0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH8.8溶液200 μ lを入れ、数秒間振盪後、直ちにマイクロプレートリーダー（コロナMTP-32）で525nmの吸光度を測定して定量した。なお、DMBは、常に測定の日日に新しく調整した。クレアチニン補正は行なわなかった。平均値+2.5SDを示すものについて、2次スクリーニングを行なった。

【2次スクリーニング】尿ろ紙の3/16インチパンチ12枚をとり、うち6枚は400mUコンドロイチナーゼAC含有0.4M-酢酸バッファーpH6.0の100 μ lに、残り6枚はコントロールとしてコンドロイチナーゼACを含まない0.4M-酢酸バッファーpH6.0の100 μ lに浸して、各々を37 $^{\circ}$ Cで一昼夜インキュベートした。その後、この各々に0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH8.8を0.3mlさらに加えて、1次スクリーニングと同様にしてムコ多糖を抽出して測定した。コンドロイチナーゼAC消化によっても、測定値が十分下がらなかったものについてのみ、3次スクリーニングを行なうこととした。

【3次スクリーニング】尿50mlよりムコ多糖を抽出し、カルバゾール・硫酸法にてムコ多糖の総量を定量し、セルロースアセテート膜電気泳動にてムコ多糖の種類を同定した。

結果

【コンドロイチナーゼAC消化の検討】図1に示すように、コンドロイチナーゼAC、40mU、400mUの各々により、コンドロイチン硫酸A/Cは、次第に

消化されて、吸光度は減少していった。これに対して、デルマトン硫酸は変化しなかった。2次スクリーニングに使用する酵素量としては、40mUでも十分であると推測された。正常者4名、Hunter病患者7名の尿を用いて、コンドロイチナーゼAC,400mUで消化したものとしなないものについて、吸光度の変化を求めた。図2に示したように、実際の尿検体に含まれるコンドロイチン硫酸A/Cも消化することができ、コンドロイチン硫酸A/Cによる陽性検体を区別することができた。

【1次スクリーニング】1カ月乳児380検体について測定した結果、測定値は、 0.0382 ± 0.0155 (O.D. 525nm)、 9.55 ± 3.88 (mg/dl)で、+2.5SDを示す陽性検体は、10検体で2.63%であった。

【2次スクリーニング】10検体中、コンドロイチナーゼACの400mUの消化によっても、吸光度があまり変化しなかった2検体(図3の白丸)を陽性と判定した。2次スクリーニングにより、8検体が除外されたため、最終精検率は0.53%となった。

【3次スクリーニング】上記の2名について、小児科外来に尿を提出するよう、郵送により依頼した。

考察

ジメチルメチレンブルーによる呈色反応は、ほぼすべてのムコ多糖に対して反応するため、正常検体においても陽性を示すことが少なくない。正常者の尿において反応を示すものは、主にコンドロイチン硫酸A/Cである。これに対して、表1に示すように、ムコ多糖症患者において多く排泄されているのは、デルマトン硫酸やヘパラン硫酸、ケラタン硫酸といったものである。そこで、電気泳動をする精検検体の数を減らしてより効率よく

図1. コンドロイチナーゼAC消化による吸光度の変化

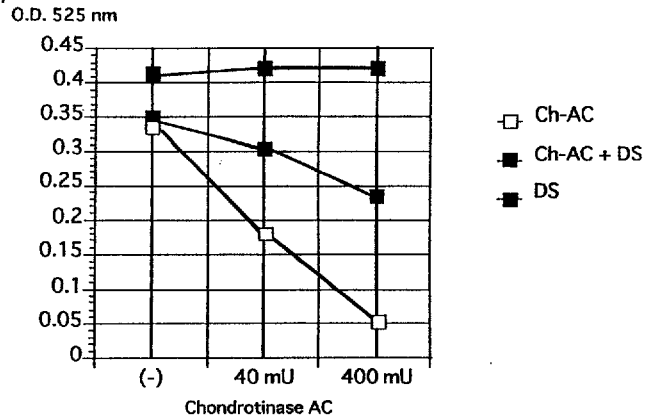


図2. Hunter病と正常者のchondroitinase AC消化の比較

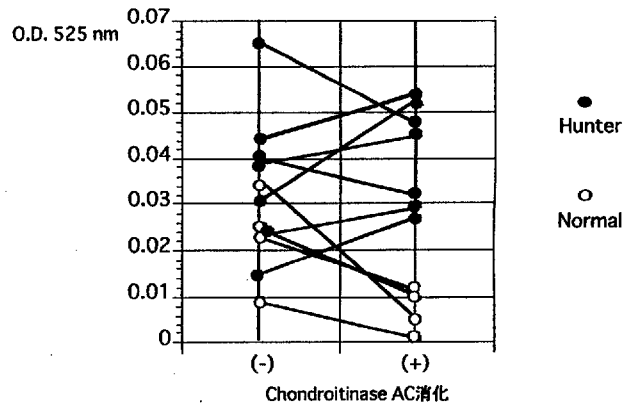
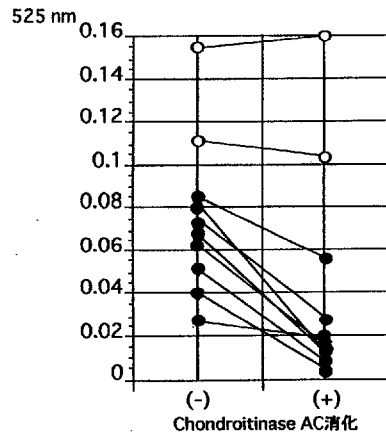


図3. 1カ月児2次スクリーニングの結果



患者スクリーニングができるよう、2次スクリーニングとしてコンドロイチナーゼAC消化によるステップを加えた。このことにより、コンドロイチン硫酸A/Cのために陽性となっているであろう検体を区別することができた。

他方、ムコ多糖症IV型やVII型の一部では、異常ムコ多糖の排泄量が比較的少ないことから、ジメチルメチレンブルーの呈色反応で見逃されると推測される。

ムコ多糖症スクリーニングの目的は、(1) 早期発見により骨髄移植などの対応を早期に行ない、治療効果をあげる、(2) 遺伝相談を行なって、家族内再発(同胞や近親者における患児の出生)を防ぐ、ということが考えられる。(1)については、ムコ多糖症I型、VI型で特に効果が期待で

きる。II型、IV型の一部でも期待される。(2)の効果については、(1)の効果が期待できないような、II型の一部やIII型にとって重要であると考えられる。とくにII型は日本人に多く、ムコ多糖症患者全体の約半分を占めているうえ、伴性劣性遺伝形式をとるため、考慮が必要である。

表1に、日本における各病型の患者頻度を示し、それに対するスクリーニングによる発見率と早期治療の効果度を推定してみた。さらに、スクリーニングによって恩恵を受ける患者の割合を推定した。独断的かも知れないが、約8割以上の患者をこのスクリーニングにより発見でき、そのうちの半分の患者がスクリーニングによって治療の恩恵を受け得ると推測した。

表1. ムコ多糖症の病型とスクリーニングの効果

病型	尿中異常ムコ多糖	患者頻度 (%) n=297*	スクリーニングの 発見率 (%) **	治療効果が ある患者 (%) **	スクリーニング の効果 (%) **
MPS I	デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸	12.80	100	100	12.80
MPS II	デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸	48.80	100	50	24.40
MPS III	ヘパラン硫酸	23.20	70	0	0.00
MPS IV	ケラタン硫酸	12.50	30	80	3.00
MPS VI	デルマタン硫酸	1.00	100	100	1.00
MPS VII	デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸 コンドロイチン硫酸	0.30	50	80	0.68

*は、岐阜大学の資料による

**は、推定値



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

我々は、従来より、尿ろ紙を検体として、ジメチルメチレンブルーの呈色反応により、先天性ムコ多糖症のスクリーニングを行なって来た。しかし、この反応は、ほぼ全てのムコ多糖と反応するため偽陽性者が多く、精検に多くの手間と費用を必要とする。正常者で陽性となるものは、ほとんどがコンドロイチン硫酸 A/C の増加によるものであり、これに対し、患者ではデルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が増加している。そこで、陽性者のなかからコンドロイチン硫酸 A/C 以外のムコ多糖が増加しているものを抽出するため、コンドロイチナーゼ AC 消化を行なった。すなわち、1 次スクリーニングで陽性となった検体は、コンドロイチナーゼ AC 消化処理をしたのちジメチルメチレンブルーの呈色反応を行ない、値が正常値まで低下したものを精検より除外した。この方法で、1 カ月健診の乳児を対象にスクリーニングを行なった。その結果、精検率は、2.63%から 0.53%に低下した。これより、コンドロイチナーゼ AC 消化による 2 次スクリーニングを行なうことによって、より効率的にスクリーニングを行なうことができると考えられた。

他方、ムコ多糖症 IV 型や VII 型の一部では、異常ムコ多糖の排泄量が比較的少ないことから、ジメチルメチレンブルーの呈色反応で見逃されると考えられる。ムコ多糖症スクリーニングの目的は、(1)早期発見により骨髄移植などの治療効果をあげる、(2)遺伝相談を行なって、家族内再発(同胞や近親者における患児の出生)を防ぐ、ということが考えられる。(1)については、ムコ多糖症 I 型、VI 型で特に効果が期待でき、型、IV 型の一部でも期待される。(2)の効果については、(1)の効果が期待できないような、型の一部や型にとって重要であると考えられる。特に型は日本人に多く、ムコ多糖症患者全体の約半分を占めているうえ、伴性劣性遺伝形式をとるため、考慮が必要である。日本における各病型の患者頻度とそれに対するスクリーニングによる発見率および早期治療の効果度を推定してみると、約 8 割以上の患者をこのスクリーニングにより発見でき、そのうちの半分の患者がスクリーニングによって治療の恩恵を受け得ると考察された。