

コンドロイチナーゼA/C消化法による先天性ムコ多糖症のスクリーニング：
ろ紙尿と原尿との比較

(分担研究：新しい対象疾患に関する研究)

田中あけみ、梶田知子、一色玄

要約：ジメチルメチレンブルー（DMB）の呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニングは、偽陽性が多いという欠点がある。これは、濃縮尿においては、コンドロイチン硫酸A、Cの濃度が高くなるということが原因である。他方、先天性ムコ多糖症の患者では、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が多く排泄され、コンドロイチン硫酸A、Cの占める割合は少ない。そこで偽陽性を減らすため、2次スクリーニングとして、コンドロイチナーゼA/C消化後、DMB呈色反応を行うという操作を加えたところ、精密検査を要する検体数を約10分の1に減らすことができた。

今回、このコンドロイチナーゼA/C消化法について、ろ紙尿と原尿で比較を行なった。結果は、ろ紙尿のほうが、偽陽性者と患者とをより正確に区別することができた。これは、ろ紙尿のほうが、尿のpHや、尿中の塩、蛋白などの含有物の影響が少なく、コンドロイチナーゼA/Cが、比較的一定した良好な条件で働くことができるためと考えられた。

見出し語：先天性ムコ多糖症、スクリーニング、コンドロイチナーゼA/C消化

研究目的：先天性ムコ多糖症は、骨変形、関節拘縮、肝脾腫、心弁膜障害、巨舌、皮膚の硬化と多毛、角膜混濁、知能障害、難聴などを症状とする先天性代謝異常症で、大きく6つの病型

に分けられている。近年、骨髄移植が有効な治療法として認められ、より良い効果を得るために、早期診断が重要となってきた。他方、先天性ムコ多糖症の多くは、発症時期が比較的遅い

大阪市立大学医学部小児科

ため、家族内発症を防ぐためにも早期診断は重要である。新生児期、乳児期に、先天性ムコ多糖症のスクリーニングをより効果的に行う方法を検討した。

ジメチルメチレンブルー (DMB) の呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニングは、簡便かつ安価であるが、偽陽性が多いという欠点がある。これは、濃縮尿においてコンドロイチン硫酸A, Cの濃度が高くなるため、正常者でも濃く呈色することが原因である。そこで2次スクリーニングとして、コンドロイチナーゼA/C消化後、DMB呈色反応を行うという操作を加え、先天性ムコ多糖症の患者で多く排泄されているデルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸を特異的に呈色させる方法を試みた。今回は、コンドロイチナーゼA/C消化の精度について、原尿とろ紙尿とで比較検討した。

対象および方法：先天性ムコ多糖症と酵素診断された患者10名 (I型1名、II型4名、III型3名、VI型1名、VII型1名) と、CPC (セチルピリミジウムクロライド) 反応で陽性を示したが先天性ムコ多糖症でない者 (偽陽性者) 6名の原尿およびろ紙尿を材料とした。

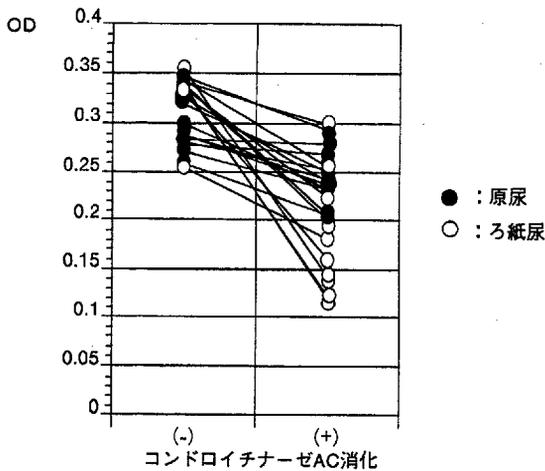
【コンドロイチナーゼA/C消化】コンドロイチナーゼA/C (生化学工業) は、0.4M酢酸バッファーpH6.0中に、4U/mlの濃度に溶解し調製した。

原尿は、尿100 μ lにコンドロイチナーゼA/C溶液100 μ lを加えて、37 $^{\circ}$ Cで24時間反応させた。対照として、尿100 μ lに酢酸バッファー100 μ lを加えたものを、同様に、37 $^{\circ}$ Cで24時間静置し

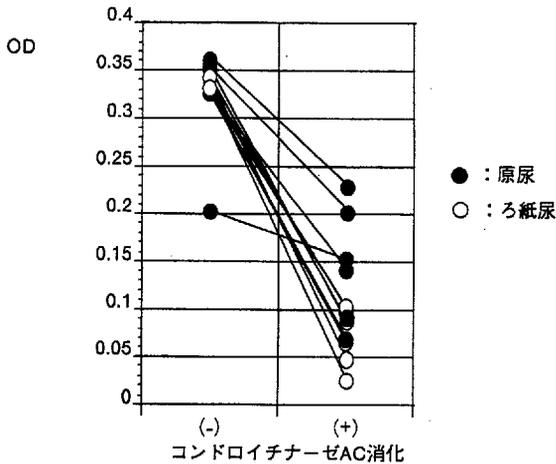
て用いた。ろ紙尿は、3/16インチパンチ6枚をコンドロイチナーゼA/C溶液100 μ lに浸し、37 $^{\circ}$ Cで24時間反応させた。対照としては、同一検体の3/16インチパンチ6枚を酢酸バッファー100 μ lに浸して、37 $^{\circ}$ Cで24時間静置した。各々のろ紙検体は、その後、0.3mlの0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH8.8に浸し、室温で48時間放置してムコ多糖を抽出した。

【ムコ多糖の測定】DMBは、0.18Mトリス・蟻酸バッファーpH8.8中に48 μ Mに溶解して調製し、反応液とした。96穴マイクロプレート上で、前述の検体50 μ lに、反応液200 μ lを加えて数秒間振とうさせ、マイクロプレートリーダー (コロナMTP-120) で525nmの吸光度を測定した。

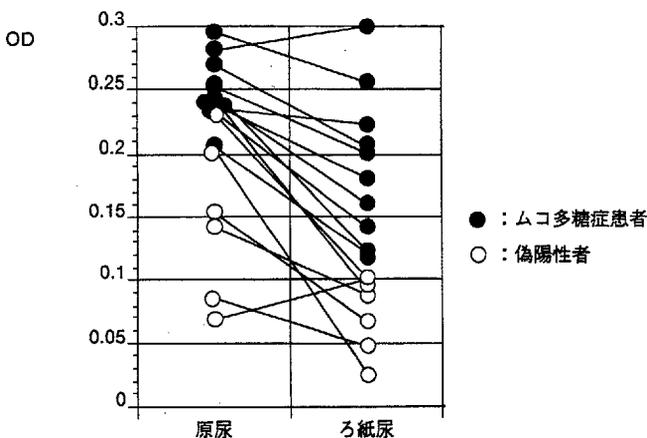
結果：図1は、ムコ多糖症患者における結果である。ろ紙尿の方が、コンドロイチナーゼA/C消化後の値にばらつきが大きいように見えるが、これは、ムコ多糖症各病型における尿中コンドロイチン硫酸A, Cの割合を、より正しく反映しているためであった。コンドロイチナーゼA/C消化により、吸光度がよく低下したのは、骨髄移植をしたVI型と、VII型およびIII型の一部であった。図2は、偽陽性者における結果である。こちらでは、逆に、ろ紙尿の方がばらつきが少ない。これは、ろ紙尿の方が、尿中コンドロイチン硫酸A, Cがより完全に消化されるためと考えられた。図3に、原尿とろ紙尿のコンドロイチナーゼA/C消化後の値を比較して示した。ろ紙尿の方が、ムコ多糖症患者と偽陽性者とを、より区別することができた。



(図1) ムコ多糖症患者における原尿およびろ紙尿での
コンドロイチナーゼAC消化



(図2) 偽陽性者における原尿およびろ紙尿での
コンドロイチナーゼAC消化



(図3) コンドロイチナーゼAC消化の原尿とろ紙尿の比較

考察：DMBは、全てのムコ多糖と反応して呈色するが、呈色の度合いは、ムコ多糖の種類によって多少異なる。すなわち、コンドロイチン硫酸C、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸の順によく呈色する。同じ濃度でも、コンドロイチン硫酸Cは、ケラタン硫酸の約3倍の吸光度を示す。このため、ケラタン硫酸を排泄するムコ多糖症IV型や、ヘパラン硫酸を排泄するムコ多糖症III型の一部では、偽陰性となる危険があるだけでなく、コンドロイチン硫酸A、Cが濃くなった正常者の濃縮尿は、偽陽性を示す。

このため、DMB呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニングは、多くの偽陽性者が出る。そこで、1次スクリーニング陽性者に対して2次スクリーニングとしてコンドロイチナーゼA/C消化を行った。これによって、精密検査を要する検体数を1/10に減らすことができた。さらに今回の検討結果より、コンドロイチナーゼA/C消化法においては、ろ紙尿の方が原尿よりムコ多糖症患者と偽陽性者とを、よりはっきり区別することができることがわかった。

平成7年度のスクリーニング総数は950検体で、1次スクリーニング陽性は29検体で3%、2次スクリーニング陽性は2検体で0.2%であった。この2検体は、抽出液が混濁しており、ウロン酸の定量と電気泳動とを行なったが、2検体とも正常であった

コンドロイチナーゼA/C消化による2次スクリーニングによって偽陽性を少なくすることができた。しかしながら、偽陰性の危険は、改善されておらず、さらに検討が必要である。



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:ジメチルメチレンブルー(DMB)の呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニングは、偽陽性が多いという欠点がある。これは、濃縮尿においては、コンドロイチン硫酸 A,C の濃度が高くなるということが原因である。他方、先天性ムコ多糖症の患者では、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸が多く排泄され、コンドロイチン硫酸 A,C の占める割合は少ない。そこで偽陽性を減らすため、2 次スクリーニングとして、コンドロイチナーゼ A/C 消化後、DMB 呈色反応を行うという操作を加えたところ、精密検査を要する検体数を約 10 分の 1 に減らすことができた。

今回、このコンドロイチナーゼ A/C 消化法について、ろ紙尿と原尿で比較を行なった。結果は、ろ紙尿のほうが、偽陽性者と患者とをより正確に区別することができた。これは、ろ紙尿のほうが、尿の pH や、尿中の塩、蛋白などの含有物の影響が少なく、コンドロイチナーゼ A/C が、比較的一定した良好な条件で働くことができるためと考えられた。