

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：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

鈴木義之, 桜庭 均, 加瀬良一,
齋藤貴子, 大竹 明, 高柳正樹*

要約 尿濾紙を試料としたムコ多糖症のスクリーニングが可能かを調べるため、1, 9-Dimethylmethylen Blue (DMB) 法による検討を行った。試料として尿そのものを用いる直接法で測定した場合、400 μ g/ml の濃度に至るまで標準物質のコンドロイチン6硫酸を測定でき、既知の患者群と対照群との判別が可能であった。しかし、試料として尿濾紙を用いた場合、現行法では、濾紙からのムコ多糖の抽出度が低く、今後改良すべきと考えられる結果を得た。

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

研究方法

症候群(8歳と11歳、いずれも男性)を含んでいる。

1) 尿検体

試料とした尿検体のうち、ムコ多糖症患者尿は、既に酵素活性測定及び電気泳動法による尿分析で診断が確定されたものを用いた。患者は、1例の Hurler 症候群(24歳、男性)、2例の Hunter

2) 尿を試料とした直接法によるムコ多糖の測定凍結保存した原尿を解凍し、その遠心(1,500 \times g, 30分間)上清を試料に用いた。コンドロイチン6硫酸(生化学工業)を水または正常者由

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*)

来の尿に溶解し、標準液として用いた。10 μ l の試料（尿検体または標準液）に 1 ml の 35 μ M 1, 9-Dimethylmethylen Blue (DMB, Aldrich Chem. Co.) を含む 0.18 M Tris-50 mM Formate buffer (pH 8.8) を加えて発色させ、525 nm で吸光度を測定した。

3) 尿濾紙を試料としたムコ多糖の測定

2 \times 3 cm の濾紙片（東洋濾紙 No.327）に 500 μ l の標準液を浸み込ませ、一晚室温で乾燥させた。濾紙の半分を細片にして、750 μ l の水を加えて、室温・1 時間でムコ多糖を抽出した。抽出後の遠心（7,000 \times g, 10 分間）上清を 20 μ l 採取し、1 ml の DMB 発色液を加えて、直接法に準じて測定した。

結果と考察

水にコンドロイチン 6 硫酸を溶解したものを試料とした場合、直接法でどの位の濃度まで測定できるかを検討した（図 1）。この場合には、当該物質の濃度が、少なくとも 400 μ g/ml に至るまで、525 nm での吸光度との間に直線性が認められた。次に、コンドロイチン 6 硫酸を水に溶解した場合と、同じ物質を正常由来の尿に溶解した場合とで、吸光度に差が見られるかを検討した（図 2）。その結果、両者に差は見られず、濃度 400 μ g/ml まで直線性が認められた。続いて、直接法による測定を行い、既知のムコ多糖症患者群と対照群の尿中ムコ多糖量の比較を行った（図 3）。尿中ムコ多糖量は、非患者であっても、年齢によって異なることが知られているため、対照群は、

0~1 歳のグループ、1~5 歳のグループ及び 5 歳以上のグループの 3 群に分類して表示した。これらの対照群では、110 μ g/ml 以下の値を示した。一方、3 例のムコ多糖症患者では、160~300 μ g/ml と高値を示した。最後に、コンドロイチン 6 硫酸を水に溶解した試料を用いて作製した濾紙マトリックスと、同物質を正常者由来の尿に溶解した試料を用いて作製した濾紙マトリックスとの間で、コンドロイチン 6 硫酸の抽出度に差が見られるかを検討した（図 4）。その結果、現行の方法では後者すなわち尿濾紙を用いた場合に、ムコ多糖の抽出度が低いことが明らかになった。

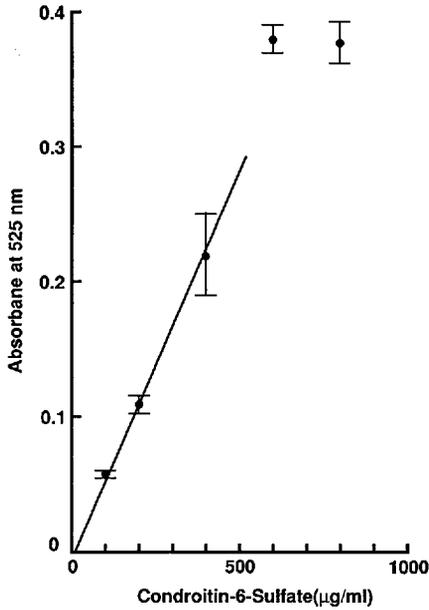
ムコ多糖症の患者を早期発見し、できるだけ発症前に治療を開始するには、マス・スクリーニングが不可欠である。その場合、試料として尿、できれば尿濾紙が試料として採用可能ならば大変便利である。今回、DMB 法により予備的検討を行ったが、尿そのものを試料とした直接的測定では、既知のムコ多糖症 3 例と対照群とが判別でき、この方法の有用性が示された。しかし、尿濾紙を試料とした場合、現行法では濾紙からのムコ多糖の抽出度が充分とはいえず、今後、この点の改善とカットオフ予想濃度付近での精度の検討が必要と考えられる。

文献

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

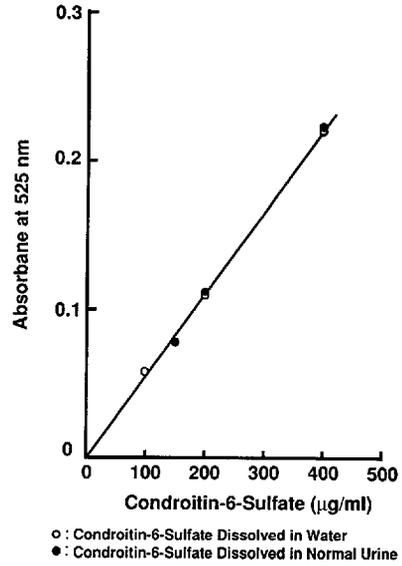
☒ 1

Linear Range of Chondroitin-6-Sulfate and 1, 9-Dimethylmethylene Blue Complex Formation



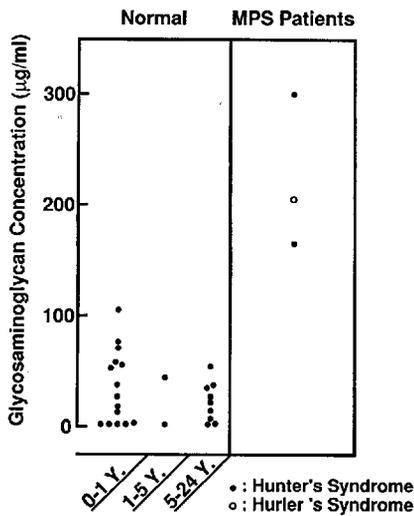
☒ 2

Standard Curve of Chondroitin-6-Sulfate and Influence of Urine on DMB Method



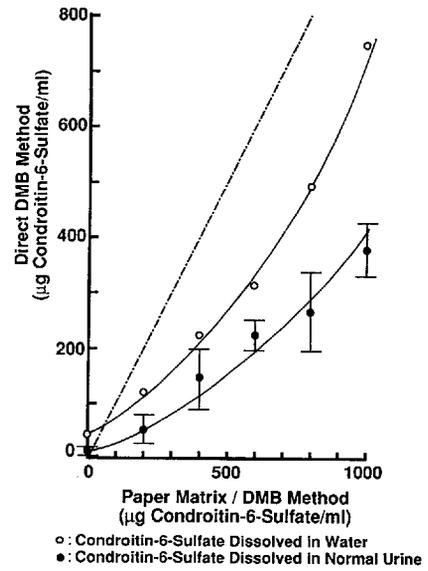
☒ 3

Glycosaminoglycan Concentration in Urine Samples Measured by DMB Method



☒ 4

Comparison of Paper Matrix / DMB Method with Direct DMB Method





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 尿濾紙を試料としたムコ多糖症のスクリーニングが可能かを調べるため、1,9-Dimethylmethylene Blue(DMB)法による検討を行った。試料として尿そのものを用いる直接法で測定した場合、400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に至るまで標準物質のコンドロイチン 6 硫酸を測定でき、既知の患者群と対照群との判別が可能であった。しかし、試料として尿濾紙を用いた場合、現行法では、濾紙からのムコ多糖の抽出度が低く、今後改良すべきと考えられる結果を得た。