

簡便な尿中 Glycosaminoglycans (GAG) 測定法 (Dimethylmethyleblue (DMB) 変法) について

金沢医科大学泌尿器科学教室 (主任: 津川龍三教授)

森山 学, 鈴木 孝治, 中嶋 千聡

川村 研二, 宮澤 克人, 津川 龍三

STUDIES ON THE MODIFIED DIMETHYLMETHYLENE- BLUE (DMB) METHOD FOR DETERMINING GLYCOSAMINOGLYCANS (GAG) IN URINE

Manabu Moriyama, Koji Suzuki, Chiaki Nakajima,

Kenji Kawamura, Katsuhito Miyazawa and Ryuzo Tsugawa

From the Department of Urology Kanazawa Medical University

The measurement of glycosaminoglycans (GAG) in urine is very important because GAG is an essential constituent of urinary diseases.

Since previously reported methods of determination of GAG are quite complicated, dangerous or not stable, we developed a very simple and rapid method to estimate the content of GAG in urine using a microplate and microplate reader.

An aliquot of diluted urine is mixed with a 1,9, dimethylmethyle blue (DMB) dye. The assay is based on the metachromatic shift in absorption maximum which occurs when sulfated glycosaminoglycans are added to the dye. The recovery of GAG is good. Other urinary compounds such as sugar, protein and blood did not influence the measurement of GAG. A good correlation was obtained between the modified DMB method and Blumenkrantz and Asboe-Hansen's method ($r=0.737$, $p<0.001$).

The accuracy of this method makes it useful for screening urinary diseases.

(Acta Urol. Jpn. 40: 565-568, 1994)

Key words: Glycosaminoglycans, Microplate method, Dimethylmethyle blue

緒 言

Glycosaminoglycans (以下, GAG と略す) は, ヘキソサミンとウロン酸より構成される多糖であり, 脊椎動物の諸臓器および結合組織において, さまざまな蛋白と結合して存在している¹⁾. 尿中 GAG については尿路粘膜表層の生体防御層としても知られ, 分子量は組織より小さく 5,600~30,000を示し, その組成はおもにコンドロイチン硫酸, ヘパラン硫酸よりなり, 少量のデルマトン硫酸, ケラタン硫酸, およびヒアルロン酸を含んでいる^{2,3)}. GAG は, 尿路系も含め細胞表層の構成成分として重要な役割を果たしている反面, 細胞表層の生物学的変化および物理学的影響, 具体的に示すと炎症性変化, 腫瘍, 代謝異常, 膠原病, 尿路結石症などにより, 量および質が変化するこ

とが, 多くの研究者により報告されている⁴⁻¹²⁾. 尿中 GAG 測定法は現在までに数多く考案されているが¹³⁻¹⁷⁾, スクリーニング検査のように簡便で安全かつ速やかに測定できる方法はあまり報告されていない. 今回われわれはその測定法の中でも dimethylmethyle blue assay¹⁸⁾ (以下 DMB 法と略す.) について検討しスクリーニングに適応するよう microplate 法を開発した (modified DMB 法), またその測定法について基礎的検討を行うとともに Blumenkrantz & Asboe Hansen の測定法¹⁵⁾ (以下 B & A 法と略す.) と比較検討を行ったので報告する.

実験方法

試料は健康成人男性20歳~40歳の尿を対象とした, 測定方法の手順は, 5 μ l の尿に 15 μ l の蒸留水を加

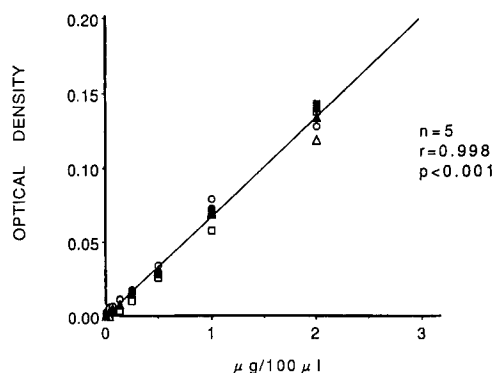


Fig. 1. Standard curve of modified dimethylmethylene-blue (DMB) method.

えることにより4倍希釈尿20 μ lとして microplate に注入, これに DMB-Tris 試薬 (DMB 試薬と Tris 液を 10:1 の割合いで pH 8.8 に調整) を 180 μ l 加えて全量 200 μ l とし, この溶液をよく攪拌した後マイクロプレートリーダー model 450 (Bio-Rad) を用いて 535 nm の吸光度を測定した. standard としての GAG はコンドロイチン硫酸 type C (No. C-4384; Sigma Chemical Co.) を用い, 標準曲線は標準濃度 (0.0, 0.02, 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/100 μ l) を毎回同時に測定し, standard curve を求めた. standard および sample はすべて triplication して測定した. 原法を次の2点で改良した.

- 1) 原法では sample 250 μ l 用いて測定を行っているがわれわれは多数の検体を測定できるよう microplate と microplate reader を使用し 20 μ l とした.
- 2) 原法では dimethylmethylene blue のみを試薬として使用していたため尿中に存在する蛋白によって GAG の測定値がかなり低い値となった¹⁸⁾. そこでわれわれは de Jong (1992) らの報告¹⁸⁾と同じく, DMB と 2 mol/L Tris solution を 10:1 の割合にて混合し pH 8.8 に調整した試薬を用いた.

実験結果

modified DMB 法を用いて標準濃度溶液測定値の変動と標準曲線, 試料測定値の変動, 回収率, 尿中関連物質添加時の変化, B&A 法との相関を求めた.

1) 標準曲線 (Fig. 1)

各標準濃度を5検体ずつ測定した. その結果, 平均変動係数は2.2%であり各濃度の平均値と吸光度に直線関係 ($r=0.998$, $P<0.001$) が認められた. また, この標準曲線は再現性に優れていたが毎回 triplica-

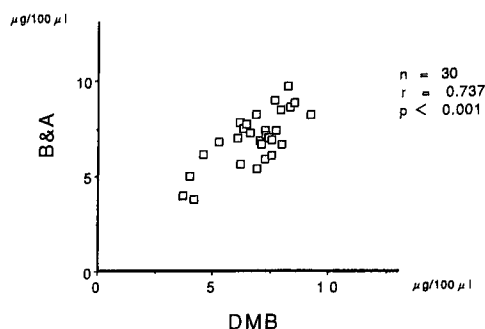


Fig. 2. Relationship between modified DMB method and B&A method.

Table 1. Coefficient of variation of triplicate determinations on urine sample

Sample No.	GAG in sample μ g/100 μ l			average	Coefficient of variation
	(1)	(2)	(3)		
1	7.74	7.85	8.09	7.89	2.30%
2	6.19	6.92	7.38	6.82	9.01%
3	8.51	7.30	7.53	7.81	8.84%
4	7.00	7.45	7.22	7.22	3.15%
5	7.98	7.00	7.83	7.60	7.00%
6	8.44	8.36	7.83	8.21	4.04%
7	6.66	7.57	6.67	6.97	7.49%
8	6.19	6.07	6.30	6.19	1.82%
9	9.00	6.97	7.87	7.95	13.70%
10	6.60	6.55	6.75	6.63	1.60%
11	6.97	6.37	6.75	6.70	4.53%
12	6.82	6.82	6.07	6.57	6.59%
13	7.59	7.90	7.71	7.73	2.03%
14	7.21	7.21	7.21	7.21	0.00%
15	7.77	7.65	7.50	7.64	1.82%
16	7.91	7.54	6.80	7.42	7.60%
17	7.09	7.77	7.50	7.45	4.65%
18	7.02	7.26	9.69	7.99	18.43%
19	9.69	7.67	9.04	8.80	11.72%
20	8.35	8.21	8.39	8.32	1.15%
average				7.46	5.87% (S.D. 5.5)

tion して試料を測定し標準曲線をえた.

2) 試料測定値の変動

20検体測定時の平均 GAG 濃度は Table 1 に示すように 7.5 μ g/100 μ l で, 平均変動係数は5.9%であった.

3) 既知量添加時の GAG 回収率

各試料に 3.0 μ g/100 μ l 添加しての回収率を求めた. 結果は Table 2 に示したように72.6~117.4%で平均88.3%であった.

4) 尿中関連物質添加時の変化

関連物質が本法に影響を与えるかどうかを検討し

Table 2. Recovery of 3.0 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ chondroitine sulfate added to urine

Sample No.	GAG in control ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	GAG found after addition of 3.0 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ GAG ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	recovery (%)
1	7.89	10.87	99.1
2	6.82	9.30	82.7
3	7.81	10.57	92.0
4	7.22	9.99	92.3
5	7.60	11.13	117.4
6	8.21	10.39	72.6
7	6.97	9.45	82.6
8	6.19	8.67	82.6
9	7.95	10.28	77.6
10	6.63	9.75	103.9
11	6.70	9.45	91.6
12	6.57	9.18	86.9
13	7.73	10.25	83.9
14	7.21	9.97	91.9
15	7.64	9.82	72.7
16	7.42	9.72	76.6
17	7.45	9.98	84.2
18	7.99	11.14	104.9
19	8.80	11.38	86.1
20	8.32	10.84	84.1
average	7.46	10.11	88.3 (S.D. 11.3)

Table 3. Effect of various compounds on determination of GAG

substance	adding volume	results
1	none	100.00%
2	glucose 2.0 g/ 100 ml	98.29%
3	albumin 30 mg/ 100 ml	95.56%
4	albumin 300 mg/ 100 ml	91.49%
5	blood 1 ml/1000 ml	113.55%

た。関連物質としては glucose (041-00545; WAKO Pure Chemical Industries LTD.), albumin (No. A-8763; Sigma Chemical Co.), 血液を添加しそれぞれについて GAG 濃度を測定したところ無添加100%に対して91.5%~113.6%であり (Table 3), これらの物質から著しい影響なく測定できると判断された。

5) 本測定法と B&A 法との同一検体での比較

両測定法にて同一検体を20検体測定し検討した。その結果は Fig. 2 に示したように, 両法による測定値の相関係数は0.737であり有意な相関を示す結果をえた。

考 察

ヒトの体内の諸臓器および結合組織には, 細胞間物

質としてムコ多糖類が蛋白と結合して, 蛋白複合体 (プロテオグリカン) として存在する⁸⁾。尿管, 膀胱, 尿道などの尿路組織における GAG の役割は大きく, 組織の構造形成やイオン平衡などの組織代謝または細菌感染防御機構の一環として重要な役割をはたしていると考えられている⁹⁾。一方尿中にも GAG が存在し, その由来は腎において濾過された血清中 GAG かあるいは腎の結合組織, 尿路粘膜表層の GAG とされている。臨床面において, 尿中の GAG 測定は組織 GAG の代謝の反映としてムコ多糖症等の診断に用いられてきた。現在では代謝性疾患のみならず炎症性変化, 腫瘍, 尿路結石症などにおいてもその値に変化をきたすことが報告されており, 以前より多くの研究者により多くの方法でその測定が行われてきた。現在までに報告されている方法はいずれも優れた方法ではあるが, 手技が複雑なうえにほとんど overnight あるいはそれに近い時間を要しそのうえ強酸性の試薬を必要とするものが多いのが難点であった。そこでわれわれはさまざまな測定法を検討した結果, Farndale らによる DMB 法¹⁶⁾が適当であると考え, さらにスクリーニングにも利用できるように原法を microplate 法として改良した。この結果従来までの方法と異なり GAG 濃度を安全で速か, かつ容易に測定できるようになった。この測定法の基本原理は尿中 GAG に対し色素試薬を用いて発色させその吸光度をみることにある。なお本法以外にも Carbazole 法¹⁰⁾, B&A 法, Alcian-blue 法¹⁴⁾, Bitter and Muir 法¹³⁾などの方法が知られている。今回われわれはそのなかでも B&A 法に比べて本法がすぐれていると思われる点を一覧表にまとめた (Table 4)。表にも示されているようにによりもスクリーニングに利用しやすい検査法であり今後は実際の疾患に対して検討する予定である。

Table 4. Relationship between modified DMB method and B&A method

	modified-DMB 法	B & A 法
通常 1 回で測定可能な検体数	40 検体	10 検体
測定時間	30~45 分	6~8 時間
必要とする試料の量	20 μl /1 検体	6 ml/1 検体
濃硫酸等の危険な試薬	なし	あり
尿の前処理	なし	あり

結 語

尿中 GAG 濃度の測定を簡易化し, 安全で短時間に測定でき, かつ容易に日常臨床検査に利用できるよ

うに modified DMB 法を開発した。この測定法における測定値の再現性および回収率は満足できるものと思われ今後スクリーニング法として十分利用しうるものと思われる。

本論文の要旨は第 361 回日本泌尿器科学会北陸地方会において報告した。

文 献

- 1) 梨本いずみ, 田村紀子, 伊藤正毅: Glycosaminoglycan. 日臨 48: 494-497, 1990
- 2) Varadi DP, Cifonelli JA and Dorfman A: The acid mucopolysaccharides in normal urine. Biochem Biophys Acta 141: 103-117, 1967
- 3) Wasteson A and Wesseler E: Molecular size and xylose content of urinary glycosaminoglycans. Biochem Biophys Acta 252: 13-18, 1971
- 4) 大平敦彦: 細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能. 代謝 21: 305-313, 1984
- 5) 馬場志郎, 早川正道, 中沢和子, ほか: 尿路悪性腫瘍患者の尿中ムコ多糖体排泄量とその組成分布. 日泌尿会誌 74: 39-45, 1983
- 6) 馬場志郎: 膀胱癌診断における尿中ヒアルロン酸定量の意義, II 膀胱癌患者におけるヒアルロン酸尿症. 日泌尿会誌 74: 1362-1369, 1983
- 7) 高村真一, 三宅弘治: 膀胱腫瘍間質におけるプロテオグリカンの免疫組織化学的局在. 泌尿紀要 37: 329-334, 1991
- 8) 村田克己: プロテオグリカン. 日臨 43: 302-304, 1985
- 9) 白根由美子, 山本晶弘, 水田耕治: 尿中物質とグリコサミノグリコサンの硫酸カルシウム結晶の凝集に対する作用. 日泌尿会誌 80: 7 1000-1003, 1989
- 10) Suzuki K, Moriyama M, Nakajima C, et al.: Isolation and partial characterization of crystal matrix protein as a potent inhibitor of calcium oxalate crystal aggregation: Evidence of activation peptide of human prothrombin. (Urol Res in press)
- 11) Iozzo RV: Proteoglycans: Structure, function, and role in neoplasia. Lab Invest 53: 373-396, 1985
- 12) Parsons CL, Schmidt JD and Pollen JJ: Successful treatment of interstitial cystitis with sodium pentosanpolysulfate. J Urol 130: 51-53, 1983
- 13) Bitter T and Muir H: A modified uronic acid carbazole reaction. Anal Biochem 4: 330-334, 1962
- 14) Whiteman P: The quantitative measurement of alcian blue-glycosaminoglycan complex. Biochem J 131: 343-350, 1973
- 15) Blumenkrantz N and Asboe-Hansen G: New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem 54: 484-489, 1973
- 16) Farndale RW, Sayers CA and Barrett AI: A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage culture. Connect Tissue Res 9: 247-248, 1982
- 17) Boartold PM and Page RC: A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans. Anal Biochem 150: 320-324, 1985
- 18) de Jong JGN, Wevers RA and Sambeek RL: Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: An improved screening procedure for mucopolysaccharides based on dimethylmethylene blue. Clin Chem 38: 803-807, 1992
- 19) Dische Z: A new specific color reaction of hexuronic acids. J Biol Chem 167: 189-198, 1947

(Received on November 12, 1993)
(Accepted on March 14, 1994)