

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：26301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19200

研究課題名(和文)分光法によるアルカプトン尿症のスクリーニング検査法開発に関する研究

研究課題名(英文) Absorbance measurements for diagnosing alkaptonuria

研究代表者

徳原 康哲 (TOKUHARA, YASUNORI)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師(移行)

研究者番号：60746329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルカプトン尿症はアミノ酸代謝異常症である。アルカプトン尿にアルカリ溶液を添加すると、尿の色調は暗褐色に変化する。本研究では、この色調変化を利用したアルカプトン尿症のスクリーニング検査法を考案した。アルカリ溶液添加後に暗褐色化したアルカプトン尿の吸光度を分光法により測定した結果、2つのピークをもつ特有な吸収曲線を示した。さらに、酸化剤である結晶次亜塩素酸ソーダとアルカリ溶液を組み合わせるとアルカプトン尿に添加する事により、尿の暗褐色化は急速に進むことが明らかとなった。

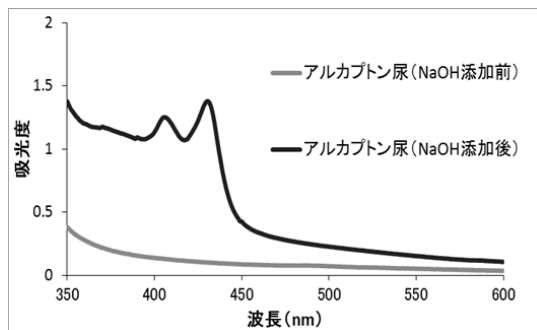
研究成果の概要(英文)：Alkaptonuria is an amino acid metabolic disorder. The urine of patients with alkaptonuria turns dark brown at room temperature after several hours to days and this color change is accelerated by addition of alkali. In order to develop a facile screening test for alkaptonuria, we added alkali to urine samples obtained from patients with alkaptonuria and measured the absorbance spectra. Addition of alkali to alkaptonuric urine exhibited characteristic absorption peaks at 406 nm and 430 nm. In addition, we added alkali with sodium hypochlorite pentahydrate, which is a strong oxidant, to alkaptonuric urine and observed changes in its color. Urine became a darker brown following the addition of alkali with sodium hypochlorite pentahydrate than with addition of alkali.

研究分野：病態検査学

キーワード：アルカプトン尿 ホモゲンチジン酸 ベンゾキノン酢酸 分光法 酸化剤 結晶次亜塩素酸ソーダ

1. 研究開始当初の背景

アルカプトン尿症は、常染色体劣性遺伝のアミノ酸(フェニルアラニン)代謝異常症である。主な臨床像には尿の暗褐色化、眼球結膜や耳介などへの褐色色素沈着、肩関節、膝関節、股関節などの大関節に発症する関節炎がある。病因は、チロシン代謝酵素のひとつであるホモゲンチジン酸オキシダーゼの遺伝的欠損にある。この酵素の欠損により、フェニルアラニンがチロシンを経てアセト酢酸に代謝される過程に異常を呈し、基質であるホモゲンチジン酸(HGA)が尿中に大量に排泄される。尿は、HGAが酸化しベンゾキノン酢酸(BQA)が生成されることにより色調が暗褐色へと変化する。HGAおよびBQAの蓄積が結合組織中に起こることで、組織褐変、さらには関節炎が発症する。また、アルカプトン尿にアルカリ溶液を加えると、HGAの酸化が促進され、急速な暗褐色化が起こることが広く知られている。我々は、アルカリ溶液である水酸化ナトリウム水溶液(NaOH)添加後のアルカプトン尿およびHGAの暗褐色化を、分光光度計を用いて測定した結果、406 nmと430 nmにピークをもつ独特な吸収曲線(図1)を示すことを見出した(Tokuhara et al. PLoS One 2014)。



(図1)アルカプトン尿の吸収曲線

2. 研究の目的

アルカプトン尿症患者の尿にアルカリ溶液を添加すると、尿の色調が暗褐色に変化することは広く知られている。我々は、アルカリ溶液添加1分後のアルカプトン尿の暗褐色化を、分光光度計を用いて可視光線領域(350 nm ~ 600 nm)における吸光度を測定した。その結果、406 nmと430 nmの波長にピークをもつ独特な吸収曲線を示すことを見出した。さらに、尿の暗褐色化の原因物質であるHGAにアルカリ溶液を添加した場合も同様のピークを示すことを明らかにした。そこで本研究では、我々が発見したアルカプトン尿の新たな特徴を利用した新規スクリーニング検査法の開発を目的として研究をおこなう。

3. 研究の方法

アルカプトン尿およびHGA溶液の暗褐色化促進の検討: HGAからBQAへの酸化反応を促進させるため、酸化剤で結晶次亜塩素酸ソーダ($\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (カネカ社) を使用し、酸

化反応による暗褐色化を促進させた。NaOHに $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解させた水溶液をアルカプトン尿およびHGA溶液にそれぞれ添加し、色調の変化および吸収曲線を分光法により測定した。

吸収曲線における2つのピーク(406 nm, 430nm)が出現するHGA濃度の測定: 様々な濃度のHGA溶液(800, 400, 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100 mg/L)を調整し、NaOHに $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解させた水溶液をそれぞれ添加し、吸収曲線を分光法により測定した。

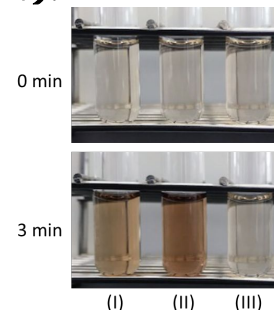
アルカリ溶液添加時のHGA溶液の酸化反応を解析: liquid chromatography time-of-flight mass spectrometer (LC/TOF-MS)により、アルカリ溶液添加時のHGAの変化を解析した。

アルカリ溶液添加時のHGA溶液の構造変化を解析: nuclear magnetic resonance(NMR) spectrometryにより、アルカリ溶液添加時のHGAの構造式の変化を解析した。

共存物質の影響: HGA溶液に様々な濃度のアスコルビン酸(500, 400, 300, 200, 100 mg/L)を溶解させ、NaOHまたはNaOHに $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解させた水溶液を添加し、吸収曲線を分光法により測定した。また、HGA溶液に様々な濃度の抱合型ビリルビン(200, 150, 100, 50 mg/L)を溶解させ、NaOHまたはNaOHに $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解させた水溶液を添加し、吸収曲線を分光法により測定した。

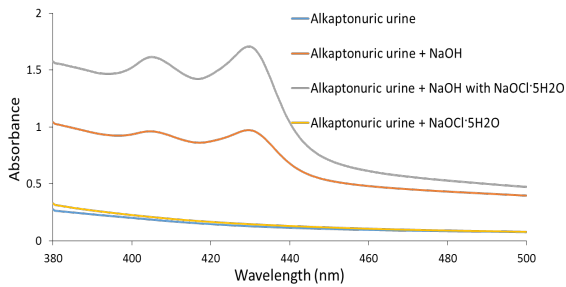
4. 研究成果

アルカプトン尿およびHGA溶液の暗褐色化促進の検討: アルカプトン尿にNaOHを添加した試験管とNaOHと $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を添加した試験管は色調が変化した(図2)。また、試験管は、試験管よりも暗褐色化が促進された(図2)。一方、アルカプトン尿に $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ のみを添加した試験管は色調変化を示さなかった(図2)。アルカプトン尿にNaOHを加えたものでは、406nmおよび430nmに吸収極大が観察された(図3)。また、NaOHと $\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を添加したものでは、2つの吸収極大における吸光度が有意に増加した(図3, 4)。

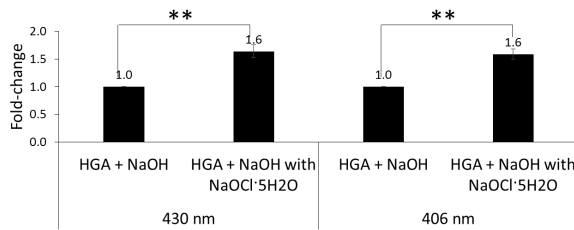


(図2)アルカプトン尿の色調変化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

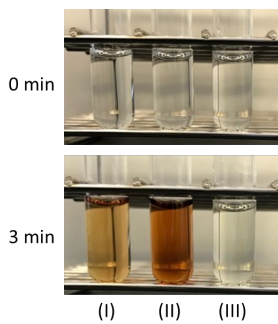


(図3)アルカプトン尿の吸収曲線の比較

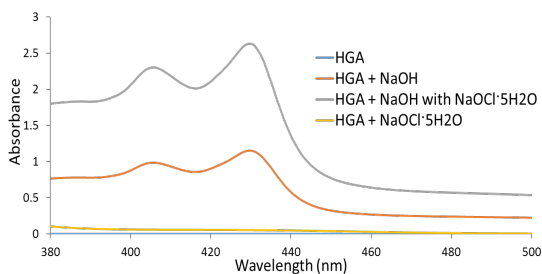


(図4)406 nm および 430 nm の
吸光度比較(アルカプトン尿)

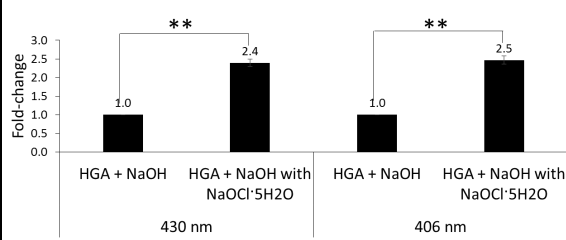
HGA 溶液に NaOH を添加した試験管 と NaOH と NaClO · 5H₂O を添加した試験管 は色調が変化した(図5)。また、試験管 は、試験管 よりも暗褐色化が促進された(図5)。一方、アルカプトン尿に NaClO · 5H₂O のみを添加した試験管 は色調変化を示さなかった(図5)。アルカプトン尿に NaOH を加えたものでは、406nm および 430nm に吸収極大が観察された(図6)。また、NaOH と結晶次亜塩素酸ソーダを添加したものでは、2 つの吸収極大における吸光度が有意に増加した(図7, 8)。



(図5)HGA 溶液の色調変化

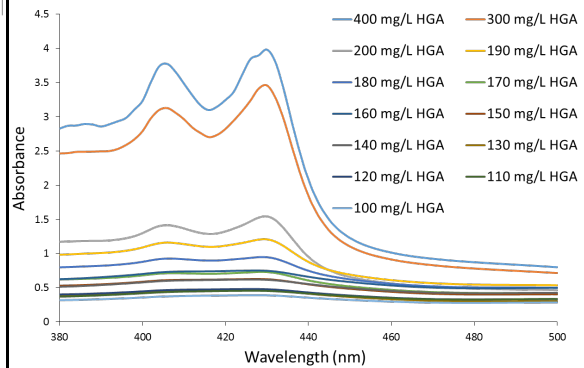


(図6)HGA 溶液の吸収曲線の比較



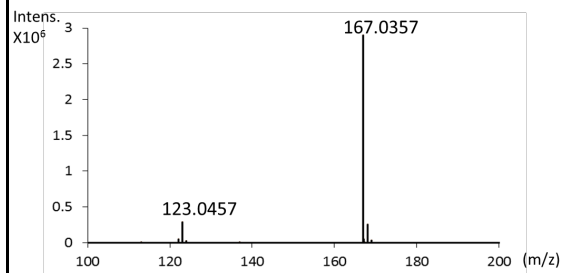
(図7)406 nm および 430 nm の
吸光度比較(HGA 溶液)

吸収曲線における 2 つのピーク (406 nm, 430nm) が出現する HGA 濃度の測定: HGA 溶液の濃度が低下するに従い、406 nm と 430 nm の 2 つのピークの吸光度は低下した(図8)。吸収曲線中に 2 つのピークを確認できたのは、180 mg/L までであった(図8)。



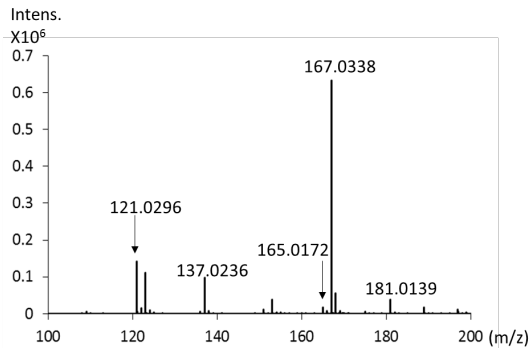
(図8)様々な濃度の HGA 溶液の吸収曲線

アルカリ溶液添加時の HGA 溶液の酸化反応を解析: LC/TOF-MS により解析した結果, HGA のイオンは 167 m/z に出現し, そのフラグメントイオンは 123 m/z に出現した(図9)。



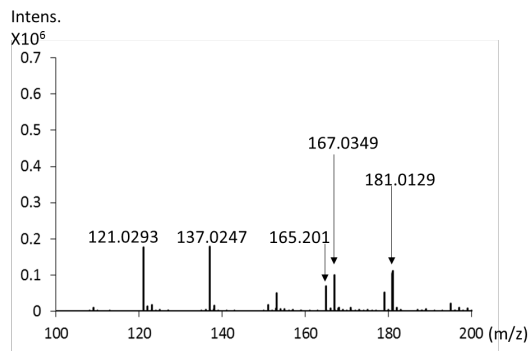
(図9)HGA のマススペクトル

NaOH を添加後の HGA のマススペクトルについては, BQA のイオンが 165 m/z に出現した(図10)。さらに, BQA の酸化物のイオンが 181 m/z に, そのフラグメントイオンが 137 m/z に出現した(図10)。



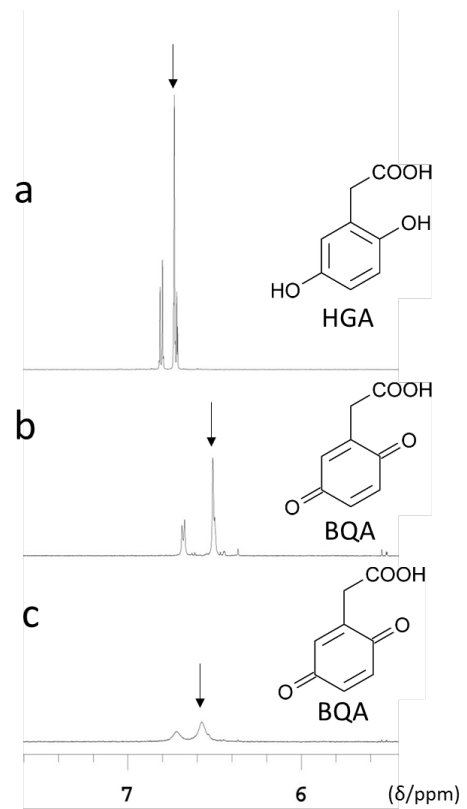
(図10)NaOH 添加後の HGA のマススペクトル

NaOH および NaClO₂・5H₂O を添加後の HGA のマススペクトルについても、同様のプロダクトイオンが観察された(図11) 図10と比較し、図11では165 m/z および181 m/z のイオン強度が高かったことから、NaClO₂・5H₂O の添加により BQA への酸化が促進された。



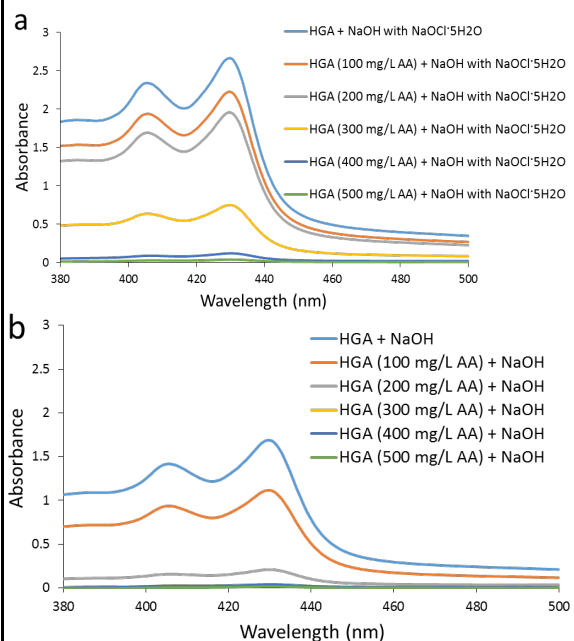
(図11)NaOH およびNaClO₂・5H₂O 添加後の HGA のマススペクトル

アルカリ溶液添加時の HGA 溶液の構造変化を解析：NMR により HGA のスペクトルを測定した結果、6.73 ppm にシングレットが検出された(図12a)。NaOH 添加後、HGA の酸化により生成された BQA は、6.50 ppm にシングレットを示した(図12b)。NaOH および NaClO₂・5H₂O 添加後、HGA の酸化により生成された BQA は、6.50 ppm にシングレットを示した(図12c)。



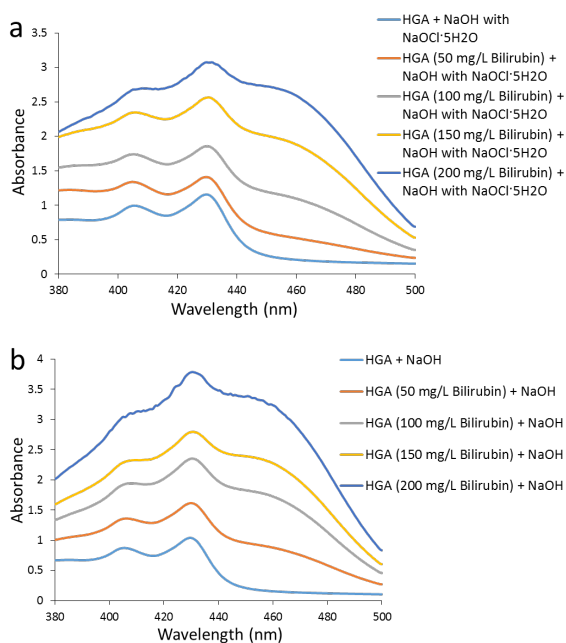
(図12)HGA の NMR スペクトル

共存物質の影響：800 mg/L の HGA 溶液に 400 mg/L 以上のアスコルビン酸が含まれていると、NaOH および NaClO₂・5H₂O を添加しても 406 nm と 430 nm に吸収極大はみられなかった(図13a)。800 mg/L の HGA 溶液に 200 mg/L 以上のアスコルビン酸が含まれていると、NaOH を添加しても 406 nm と 430 nm に吸収極大はみられなかった(図13b)。



(図13)アスコルビン酸の影響

抱合型ビリルビンの濃度増加に伴い、HGA 溶液の吸収曲線の吸光度は上昇した（**図 14**）。800 mg/L の HGA 溶液に 200 mg/L 以上の抱合型ビリルビンが含まれていると、NaOH および NaClO・5H₂O を添加した場合に 406 nm の吸収極大が消失した（**図 14a**）。NaOH を HGA 溶液に添加した場合も同様の変化が観察された（**図 14b**）。



(図 14)抱合型ビリルビンの影響

以上、研究成果 ~ より、NaOH と NaClO・5H₂O を組み合わせて添加した場合、アルカプトン尿および HGA の暗褐色化が急速に促進さ

れ、2 つのピーク（406 nm、430 nm）における吸光度も有意に増加した。また、LC/TOF-MS および NMR の結果より、NaOH のみの添加と比較し、NaOH と NaClO・5H₂O を組み合わせて添加すると、HGA から BQA への酸化反応は促進された。

研究成果 より、アスコルビン酸が尿中に存在する場合は、吸収曲線中の 2 つのピークが出現せず、偽陰性となる可能性がある。一方、尿中に抱合型ビリルビンが存在する場合は、吸光度に正誤差の影響を与える。

NaOH と NaClO・5H₂O を組み合わせて尿に添加し、尿の色調が暗褐色に変化した場合、その吸収曲線を分光法により解析する事は、アルカプトン尿症の検出に有用である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木 七海，内藤 楓，仲宗根 由華，田中 雅美，宿谷 賢一，徳原 康哲，酸化剤を用いたアルカプトン尿の暗褐色化促進の検討，第 12 回日本臨床検査学教育学会学術集会，2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳原 康哲 (TOKUHARA, Yasunori)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師
研究者番号：60746329