

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4965999号
(P4965999)

(45) 発行日 平成24年7月4日(2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月6日(2012.4.6)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 N
GO 1 N 30/06 (2006.01)	GO 1 N 30/06 E
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 30/72 C
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	GO 1 N 27/62 X

請求項の数 7 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-352214 (P2006-352214)	(73) 特許権者	506318805
(22) 出願日	平成18年12月27日(2006.12.27)		セント ルイス ユニバーシティ
(65) 公開番号	特開2008-102114 (P2008-102114A)		Saint Louis University
(43) 公開日	平成20年5月1日(2008.5.1)		アメリカ合衆国63108ミズーリ州セント
審査請求日	平成21年12月18日(2009.12.18)		ト・ルイス、セカンド・フロアー、ウエスト
(31) 優先権主張番号	60/753, 413		ト・パイン・モール3700番、セント・
(32) 優先日	平成17年12月27日(2005.12.27)		ルイス・ユニバーシティ、オフィス・オブ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		・イノベーション・アンド・インテレクト
(31) 優先権主張番号	特願2006-255869 (P2006-255869)		ユアル・プロパティ
(32) 優先日	平成18年9月21日(2006.9.21)	(74) 代理人	110000084
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムコ多糖症の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)及び(2)のステップを含む、ムコ多糖症(mucopolysaccharidosis)の診断、ムコ多糖症の治療効果の化学診断、又はムコ多糖症の各疾患の判別鑑定のための生体試料中のグリコサミノグリカン由来二糖の定量濃度及び組成を測定する方法:

(1)(a) 生体試料を限外濾過フィルターで濾過し、フィルター上でグリコサミノグリカン特異的酵素による消化を行ない、得られた消化物を遠心分離して濾過液を得るステップ、又は(b) 生体試料をグリコサミノグリカン特異的酵素による消化を行ない、限外濾過フィルターで濾過して濾過液を得るステップ;

(2)(1)で得られた濾過液を液体クロマトグラフィー/質量分析計へ注入し、グリコサミノグリカン由来の二糖について分析するステップであって、

液体クロマトグラフィーの分析条件として、分析カラムにカーボングラファイトカラムを用い、移動相にアルカリ性条件の溶液を用いることで、分析する上で最適な溶出位置にグリコサミノグリカン由来の二糖を溶出する、

ステップ。

【請求項 2】

アルカリ性条件の溶液が pH 7 ~ 11 である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

(1)のステップにおいて、グリコサミノグリカンを特異的に分解する酵素として、ケ

ラターナーゼ、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼを同時に用いて二糖を生成させ、(2) のステップにおいて、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸を一斉に分析するものである請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

(1) のステップにおいて、グリコサミノグリカンの特異的に分解する酵素として、ケラターナーゼ、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼのいずれか 1 種を用いて二糖を生成させ、(2) のステップにおいて、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸のいずれか一種類又は二種類を分析するものである請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】

グリコサミノグリカンの特異的に分解する酵素として、ケラターナーゼ I I、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼ B を同時に用いる請求項 3 記載の方法。

10

【請求項 6】

グリコサミノグリカンの特異的に分解する酵素として、ケラターナーゼ I I、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼ B のいずれか 1 種を用いる請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

(1) のステップにおいて、生体試料が血漿、血清、血液、尿、体液のいずれかである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ムコ多糖症 (mucopolysaccharidoses) の診断方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

ムコ多糖症は、正式にはムコ多糖代謝異常症といい、先天的にムコ多糖分解酵素が欠損していることにより全身にムコ多糖の分解物が蓄積し、種々の臓器や組織が次第に損なわれる進行性の疾患である。ムコ多糖症は、欠損酵素によって大きく 7 つの型に分類されている。ムコ多糖症の多くは知的障害を伴い、進行性で、成人に達するまでに死亡する型もある。主な症状は、著しい骨の変化、短い首、関節が固くなる、粗い顔つき等であり、その他、角膜混濁、難聴、肝肥腫、心臓疾患、低身長等である。

30

【0003】

ムコ多糖症の診断は、血液等の生体試料中のムコ多糖を測定することにより行なわれる。グリコサミノグリカンの測定法としては、以下の方法が知られている。

【0004】

特許文献 1 には、グリコサミノグリカン (以下、GAG という) 特異的分解酵素によって GAG を二糖に分解し、当該二糖の組成を高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC という) で分析することで GAG を分析する方法が記載されている。非特許文献 1 には、尿中のケラタン硫酸 (以下、KS という) を特異的分解酵素であるケラターナーゼによって KS を二糖に分解し、当該二糖を HPLC で分析することで KS を分析する方法が記載されている。非特許文献 2 には、血漿及び血清中の GAG を加水分解し、生成するガラクトースとアミノ糖を HPLC で分析することで GAG を分析する方法が記載されている。非特許文献 3 には、血漿及び尿中のコンドロイチン硫酸 (以下、CS という) を、限外濾過フィルターで濾過した後に、フィルター上でコンドロイチナーゼ A B C によって CS を二糖に分解し、濾過液中の当該二糖を HPLC で分析することで CS を分析する方法が記載されている。非特許文献 4 には、組織中の KS を、エタノール沈殿法により前処理した後に、ケラターナーゼ I I により二糖に分解し、当該二糖を液体クロマトグラフィー / タンデムマス質量分析計 (以下、LC / MS / MS という) へ注入し、KS 由来の二糖組成について分析する方法が記載されている。非特許文献 5 には、組織中のヘパラン硫酸 (以下、HS という) を、エタノール沈殿法により前処理した後に、特異的分解酵素で二糖に分解し、当該二糖を LC / MS / MS へ注入し、HS 由来の二糖組成について分析する方法

40

50

が記載されている。特許文献2及び非特許文献6には、尿中のGAGを1,9-ジメチルメチレンブルーを用いて測定し、ムコ多糖症の診断を行なう方法が記載されている。

また、特許文献3には、KS及びヒアルロン酸(以下、HAという)をリガンドとする固相プレートを用いたアッセイ方法が記載されている。

【特許文献1】特開平4-135496号公報

【特許文献2】特開2003-265196号公報

【特許文献3】特開平10-153600号公報

【非特許文献1】Chem. Pharm. Bull. 46(1), 97-101(1998)

【非特許文献2】Journal of Chromatography B, 765, 151-160(2001) 10

【非特許文献3】Analytical Biochemistry 302, 169-174(2002)

【非特許文献4】Analytical Biochemistry 290, 68-73(2001)

【非特許文献5】Journal of Chromatography B, 754, 153-159(2001)

【非特許文献6】Clinica Chimica Acta, 264, 245-250(1997)

【発明の開示】 20

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、従来の分析方法は、測定濃度がばらつく、測定感度が低い、前処理操作が煩雑である、一種類のGAGしか測定できない等の問題があり、ムコ多糖症の診断方法として満足できるものではなかった。

従って、本発明の目的は、生体試料中のグリコサミノグリカンを高感度かつ簡便に測定し、ムコ多糖症を正確に診断するための方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで本発明者は生体試料中の複数のグリコサミノグリカンを同時に高感度で測定する方法を見出すべく種々検討した結果、限外濾過フィルターの使用及びGAG特異的酵素消化に加えてLC/MS/MSを組み合わせることにより、生体試料中の複数のグリコサミノグリカンが高感度で同時に定量できることから、ムコ多糖症の診断が正確にできることを見出し、本発明を完成した。 30

【0007】

本発明は、以下の(A)~(E)を提供するものである。

(A) 下記ステップ(1)及び(2)を含む、ムコ多糖症の診断方法。

(1) (a) 生体試料を限外濾過フィルターで濾過し、フィルター上でGAG特異的酵素による消化を行なうか、又は(b) 生体試料をGAG特異的酵素による消化を行ない、得られた消化物を限外濾過フィルターで濾過した後、 40

得られた消化物を遠心分離して得られた濾過液を又は得られた濾過液LC/MS/MSへ注入し、GAG由来の二糖について分析するステップ。

(2) (1)の測定結果である定量濃度及び二糖組成を用いて、ムコ多糖症の診断、又はムコ多糖症の各疾患の判別鑑定を行なうステップ。

【0008】

(B) (1)のステップにおいて、HPLCの分析条件として、分析カラムにカーボングラファイトカラムを用い、移動相にアルカリ性条件の溶液を用いることで、MS分析する上で最適な溶出位置にGAG由来の二糖を溶出するものである上記(A)記載の方法。

【0009】

(C) (1)のステップにおいて、GAGを特異的に分解する酵素として、ケラターゼ 50

II、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼBを同時に含む溶液により二糖を生成させ、KS、HS及びDSを一斉に分析するものである上記(A)又は(B)記載の方法。

【0010】

(D)(1)のステップにおいて、GAGを特異的に分解する酵素として、ケラターゼII、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼBのいずれか1種を用いて二糖を生成させ、KS、HS、DSのいずれか一種類又は二種類を分析するものである上記(A)又は(B)記載の方法。

【0011】

(E)(1)のステップにおいて、生体試料が血漿、血清、血液、尿、体液のいずれかである上記(A)～(D)のいずれか1つに記載の方法。

10

【発明の効果】

【0012】

本発明の方法は、ムコ多糖症を、精度良く、高感度かつ簡便に診断できる方法である。これにより、全新生児についてムコ多糖症の検査を行なうことで、出世後の早期段階でムコ多糖症の発見が可能となる。早期段階で適切な酵素補充療法や遺伝子治療等を行なうことで、患者の病状を最小限に食い止めることが可能となる。

また、本発明の方法はムコ多糖症の診断の他、前述した治療時における治療効果の把握と治療方針の決定、さらには医薬品開発の薬効評価へも使用することが可能である。

さらに本発明の方法は、GAGに関連する疾患である変形性関節症、慢性関節リウマチ、角膜組織異常を伴う疾患、リウマチなどの炎症、癌、肝疾患におけるバイオマーカー測定法としても有用である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明方法のステップ(1)で使用する生体試料としては、ムコ多糖を含むものであれば制限されないが、血漿、血清、血液、尿、体液などが挙げられる。このうち、血漿又は血清が特に好ましい。

【0014】

本発明で使用する限外濾過フィルターとしては、ムコ多糖を通過させず、ムコ多糖よりも分子量の小さい分子を通過させるフィルターであれば制限されないが、分子量5000程度の分子を分離できるフィルターが好ましい。このような限外濾過フィルターの市販品としては、例えばULTRAFREE™-MC(BIOMAX-5)(MILLIPORE製)を用いることができる。例えばAcroPrep 96 filter plate(10K)(PALL Life Sciences製)を使用した場合は多検体同時処理が可能である。

30

【0015】

本発明で使用するGAG特異的酵素としては、グリコサミノグリカンを分解する酵素であればよいが、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸をそれぞれ特異的に分解する酵素が挙げられる。これらは1種又は2種以上を組み合わせることができる。ケラタン硫酸分解酵素、ヘパラン硫酸分解酵素及びデルマタン硫酸分解酵素の3種を組み合わせる場合には、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸の3種を一斉に分解できる。一方、これらの酵素のいずれか1種を用いれば、これらのグリコサミノグリカンの1種又は2種が分析できる。これらのGAG分解酵素としては、ケラターゼ、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼが好ましい。これらのGAG特異的酵素の市販品としては、例えばケラターゼ、ケラターゼII、ヘパリチナーゼ、ヘパリチナーゼI、ヘパリチナーゼII、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼB(生化学工業(株)製造、販売)などが挙げられる。またHS分解酵素についてはSigma社より同様の酵素が市販されており、使用することは可能である。これらのうち、ケラターゼII、ヘパリチナーゼ及びコンドロイチナーゼBの3種を組み合わせるか、これらのいずれか1種を用いるのが特に好ましい。

40

【0016】

50

本発明で実施するGAG特異的酵素による酵素消化としては、例えば30～40で1～30時間行なうことで完了する。特に37で15時間、インキュベーターにて加温するのが好ましい。

【0017】

本発明の応用として、CSあるいはHAを測定対象とする場合は、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼACII、ヒアルロニダーゼSDによりCSあるいはHAを特異的に分解することでLC/MS/MSにより分析することも可能である。

【0018】

上記のGAG特異的酵素による酵素消化によって、グリコサミノグリカンが二糖類に分解される。ここで、二糖類の略号を以下に示す。

DiHS-0S: HexA 1 4GlcNAc:
2-acetamido-2-deoxy-4-O-(4-deoxy-L-threo-hex-enopyranosyluronic acid)-D-glucose、
DiHS-NS: HexA 1 4GlcNS:
2-deoxy-2-sulfamino-4-O-(4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose、
DiHS-6S: HexA 1 4GlcNAc(6S):
2-acetamido-2-deoxy-4-O-(4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-6-O-D-glucose、MSD:
Gal 1 3GlcNAc(6S)、DSD: Gal(6S) 1 3GlcNAc(6S)。

【0019】

本発明のステップ(1)においては、(a)生体試料を限外濾過フィルターで濾過し、フィルター上でGAG特異的酵素による消化を行なって消化物を得る手段と、(b)生体試料をGAG特異的酵素による消化を行ない、得られた消化物を限外濾過フィルターで濾過する手段とが含まれる。ここで、(b)の手段には、例えば、被験者の耳から採取した微量の血液を含んだ濾紙にGAG特異的消化を行ない、その消化物を限外濾過フィルターで濾過すればよい。

【0020】

本発明で測定対象となる二糖類は、ケラターゼIIによりKSから分解されるMSD及びDSD、ヘパリチナーゼでHSから分解されるDiHS-0S、DiHS-NS及びDiHS-6S、コンドロイチナーゼBでDSから分解されるDi-4Sである。

【0021】

前記(a)酵素による消化で得られた消化物を遠心分離することにより得られた濾液又は(b)で得られた濾液をLC/MSに注入し、二糖を分析する。遠心分離は、例えば5000～8000×g、10～15分間行なうのが好ましい。

【0022】

LC/MSにおける分析カラムとしては、前記二糖類が分離できるものであればよく、例えばODS(Octadecylsilane)を固定相とした逆相HPLCカラム、カーボングラファイト等を用いることができるが、分離能の点からカーボングラファイトを用いるのが特に好ましい。カーボングラファイトの市販品としては、例えばHypercarb(2.0mm i.d.×150mm, 5µm)(Thermo Electron Corp製)等が挙げられる。カラムの長さを短くすることで二糖の溶出位置を早くすることも可能である。

【0023】

本発明において移動相としては、二糖類の溶出位置を最適な位置にする点から、アルカリ性条件の溶液が好ましい。アルカリ性条件の溶液としては、pH7～11、さらにpH8～10、さらにpH9～10、特にpH10の水溶液と有機溶媒のグラジエント条件が

10

20

30

40

50

好ましい。pHをアルカリ性条件にするための塩としては、アンモニア水又はアンモニウム塩が好ましい。アンモニウム塩水溶液としては、重炭酸アンモニウム水溶液、ギ酸アンモニウム水溶液、酢酸アンモニウム水溶液等が挙げられるが、重炭酸アンモニウム水溶液が特に好ましい。これらの塩濃度としては、溶出位置を考慮すると、3～100mmol/L、さらに3～50mmol/L、特に10mmol/Lが好ましい。有機溶媒としては、アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール等が挙げられる。最も好ましい条件は、10mmol/L重炭酸アンモニウム溶液へ28%アンモニア水を添加することによりpH10に調製した溶液(10mmol/L Ammonium bicarbonate buffer (pH10))とアセトニトリルのグラジエント条件である。

10

【0024】

図1及び図2に示すように、移動相のpHと塩濃度を調節することにより、MS分析する上で最適な溶出位置(Retention time)にGAG由来の二糖を溶出することが可能である。さらに図3に示すように移動相のpHによりピーク形状を大幅に改善することが可能であった。この手法により従来では大変困難であった糖類の溶出位置をコントロールすることが可能であった。

【0025】

これらのステップ(1)により、生体試料中のGAGの濃度及び二糖組成が得られる。ステップ(2)は、これらの結果から、ムコ多糖症の診断、ムコ多糖症の各疾患(疾患の型)が判定できる。またムコ多糖症の治療効果の診断も可能である。ここで、ムコ多糖の分類を以下に示す。

20

【0026】

【表1】

	分類名	欠損酵素
I H	Hurler 症候群	α -L-イズロニダーゼ
I S	Scheie 症候群	α -L-イズロニダーゼ
I H/S	Hurler-Scheie 複合体	α -L-イズロニダーゼ
I I A	Hunter 症候群重症型	スルホイズロン酸スルファターゼ
I I B	Hunter 症候群軽症型	スルホイズロン酸スルファターゼ
I I I A	Sanfilippo 症候群A	ヘパラン硫酸N-スルファターゼ
I I I B	Sanfilippo 症候群B	N-アセチル- α -D-グルコサミニダーゼ
I I I C	Sanfilippo 症候群C	アセチル CoA- α -グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ
I I I D	Sanfilippo 症候群D	N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ
I V A	Morquio 症候群A	N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ
I V B	Morquio 症候群B	β -ガラクトシダーゼ
V I A	Maroteaux-Lamy 症候群重症型	N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ
V I B	Maroteaux-Lamy 症候群軽症型	N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ
V I I	β -グルクロニダーゼ欠損症	β -グルクロニダーゼ

30

40

【実施例】

【0027】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0028】

50

(実施例1)

本発明のアッセイ法により血漿及び血清を用いたスクリーニングが可能か否かを調べるため、ムコ多糖症の患者血漿とヒトのコントロール血漿を用いて、以下の実験を行なった。

【0029】

血漿、血清試料の前処理方法：1) ULTRAFREE™-MC (BIOMAX-5) へ0.01 mLの血漿あるいは血清試料を添加する。2) 4,000 x g、15分間の条件で遠心する。3) ULTRAFREE™-MC (BIOMAX-5) のコレクションチューブを新規のチューブに交換する。4) コンドロシン(生化学工業(株)製造、販売)の50 µg/mL水溶液を内部標準物質として0.02 mLをフィルター上へ添加する。10
 なお、全ての実験において、水は精製水とする。5) 0.02 mLの50 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH7)をフィルター上へ添加する。6) ケラターゼII、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼBを各2 mUを含む酵素混合水溶液の0.02 mLをフィルター上へ添加する。7) 約10秒間、ボルテックミキサーにより混合する。8) 37 °Cで15時間、インキュベートで加温する。9) 8,000 x g、15分間の条件で遠心する。10) 濾過液に0.02 mLの水を添加する。11) 約10秒間、ボルテックミキサーにより混合する。12) 試料液をオートサンプラー用注入バイアルへ移す。

【0030】

検量線試料の前処理方法：1) KS標準溶液はKS(ウシ角膜由来)(生化学工業(株)製造、販売)を用いて表1に示す濃度で作成する。2) HS標準溶液として、不飽和ヘ
 パラン/ヘパリン-二糖キット(Hキット)(生化学工業(株)製造、販売)を使用し、
 DiHS-0S、DiHS-6S及びDiHS-NSを含む水溶液を表2に示す濃度で作成する。3) ULTRAFREE™-MC (BIOMAX-5) へ各0.01 mLのKS及びHS標準溶液を添加する。4) コンドロシン(生化学工業(株)製造、販売)の50 µg/mL水溶液を内部標準物質として0.02 mLをフィルター上へ添加する。5) 0.02 mLの50 mmol/L Tris-HCl緩衝液(pH7)をフィルター上へ添加する。6) ケラターゼII、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼBを各2 mUを含む酵素混合水溶液の0.02 mLをフィルター上へ添加する。7) 約10秒間、ボルテックミキサーにより混合する。8) 37 °Cで15時間、インキュベートで加温する。9) 8,000 x g、15分間の条件で遠心する。10) ブランク血漿あるいは血清をU
 LTRAFREE™-MC (BIOMAX-5) へ添加後、8,000 x g、15分間の条件で遠心し、ブランク濾過液を作成する。11) 0.01 mLのブランク濾過液を9) で得られた濾過液に添加する。12) 約10秒間、ボルテックミキサーにより混合する。13) 試料液をオートサンプラー用注入バイアルへ移す。30

【0031】

【表2】

標準溶液濃度 (KS)	(Unit: µg/mL)						
	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
MSD	7.1	3.6	2.8	1.4	0.71	0.36	0.14
DSD	2.9	1.5	1.2	0.58	0.29	0.15	0.058
Total	10	5	4	2	1	0.5	0.2

【0032】

10

20

30

40

【表 3】

標準溶液濃度 (HS)	(Unit: ng/mL)						
	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
ΔDiHS-0S	1000	500	200	100	50	20	10
ΔDiHS-NS	500	250	100	50	25	10	5
ΔDiHS-6S	1000	500	200	100	50	20	10

【0033】

以下に、使用したLS/MS/MS装置を記載する。HPLC装置：HP1100 system (Agilent Technology Inc.) (Palo Alto, CA, USA)、オートサンプラ - : HTC PAL (CTC Analytics Inc.) (Zwingen, Switzerland)、質量分析計：API 4000 (Applied Biosystems Inc.) (Lincoln Centre Drive Foster City, CA, USA)。

10

【0034】

以下に、使用したHPLC条件を記載する。分析カラム：Hypercarb (2.0 mm i.d. x 150 mm, 5 μm) (Thermo Electron Corp.) (Waltham, MA, USA)、移動相：(A) 10 mmol/L Ammonium bicarbonate buffer (pH 10)、(B) Acetonitrile、グラジエント条件：[Time (min) / B (%)] ; [0 / 0] ([0.9 / 0] ([1.0 / 30] ([6.0 / 30] ([6.1 / 0] ([8.0 / 0]、流速：0.2 mL/min、カラム温度 45、オートサンプラーへの注入量：0.01 mL。

20

【0035】

以下に、使用したMS/MS条件を記載する。イオン化法：Turbo ionspray、検出モード：Multiple reaction monitoring (MRM) - negative mode、ターボスプレー温度：650、モニタリングイオン (CIDエネルギー)：Gal¹⁻³GlcNAc (6S) m/z 462.1 - m/z 97.0 (CID: -80 eV) ; Gal (6S)¹⁻³GlcNAc (6S) m/z 462.1 - m/z 97.0 (CID: -80 eV) ; DiHS-0S m/z 378.1 - m/z 174.9 (CID: -22 eV) ; DiHS-NS m/z 416.0 - m/z 137.9 (CID: -34 eV) ; DiHS-6S m/z 458.2 - m/z 97.1 (CID: -52 eV) ; I.S. m/z 354.0 - m/z 113.0 (CID: -22 eV)。

30

【0036】

濃度の算出は、検量線濃度とピーク面積比 (各測定対象標準物質のピーク面積 / 内部標準物質のピーク面積) から最小二乗法による直線一次回帰式を求める。重み付けは1 / 検量線濃度とする。

【0037】

三種類のコントロール血清を3日間、N = 5で測定した結果を表4及び表5に示す。

40

【0038】

【表4】

	Replicates	MSD			DSD		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Batch 1	n1	0.97	0.52	0.60	0.34	0.18	0.21
	n2	0.96	0.51	0.64	0.36	0.19	0.22
	n3	1.1	0.54	0.58	0.37	0.18	0.19
	n4	0.97	0.54	0.62	0.35	0.18	0.21
	n5	1.1	0.55	0.61	0.36	0.19	0.21
	Mean	1.0	0.53	0.61	0.36	0.18	0.21
SD	0.073	0.016	0.022	0.0114	0.0055	0.0110	
CV%	7.2	3.1	3.7	3.2	3.0	5.3	
Batch 2	n1	0.94	0.59	0.70	0.35	0.19	0.22
	n2	0.93	0.59	0.67	0.37	0.18	0.21
	n3	1.1	0.54	0.65	0.34	0.18	0.21
	n4	1.0	0.58	0.65	0.35	0.19	0.20
	n5	1.1	0.58	0.63	0.35	0.18	0.20
	Mean	1.01	0.58	0.66	0.35	0.18	0.21
SD	0.083	0.021	0.026	0.0110	0.0055	0.0084	
CV%	8.2	3.6	4.0	3.1	3.0	4.0	
Batch 3	n1	1.0	0.52	0.62	0.35	0.18	0.19
	n2	1.0	0.52	0.63	0.36	0.17	0.19
	n3	0.96	0.56	0.60	0.35	0.17	0.19
	n4	1.1	0.52	0.61	0.37	0.17	0.19
	n5	0.96	0.53	0.62	0.35	0.17	0.19
	Mean	1.00	0.53	0.62	0.36	0.17	0.19
SD	0.057	0.017	0.011	0.0089	0.0045	0.0000	
CV%	5.7	3.3	1.9	2.5	2.6	0.0	
Overall (N=15)	Mean	1.01	0.55	0.63	0.35	0.18	0.20
	SD	0.067	0.028	0.030	0.010	0.0076	0.0115
	CV%	6.6	5.1	4.8	2.8	4.2	5.7

【0039】

【表5】

	Replicates	Δ DiHS-0S			Δ DiHS-NS			Δ Di-4S,6S*		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Batch 1	n1	59	53	72	19	15	19	54	17	18
	n2	58	51	70	19	16	18	53	17	24
	n3	61	55	73	22	16	21	53	19	23
	n4	60	52	77	19	15	20	52	19	28
	n5	66	53	74	20	17	18	53	17	26
	Mean	61	53	73	20	16	19	53	18	24
SD	3.1	1.5	2.6	1.3	0.84	1.3	0.71	1.1	3.8	
CV%	5.1	2.8	3.5	6.6	5.3	6.8	1.3	6.2	15.8	
Batch 2	n1	54	49	74	20	16	19	64	25	25
	n2	57	49	74	22	16	19	60	18	23
	n3	61	48	70	21	14	20	66	19	24
	n4	55	49	70	22	14	19	51	22	22
	n5	63	50	71	19	14	19	57	19	26
	Mean	58	49	72	21	15	19	60	21	24
SD	3.9	0.71	2.0	1.3	1.1	0.45	5.9	2.9	1.6	
CV%	6.7	1.4	2.9	6.3	7.4	2.3	10.0	14.0	6.6	
Batch 3	n1	58	48	62	20	14	18	60	15	19
	n2	59	48	71	22	15	19	67	18	21
	n3	59	49	68	21	14	16	75	18	20
	n4	61	52	67	19	15	18	81	18	21
	n5	57	49	67	18	15	19	66	15	20
	Mean	59	49	67	20	15	18	70	17	20
SD	1.5	1.6	3.2	1.6	0.55	1.2	8.2	1.6	0.84	
CV%	2.5	3.3	4.8	7.9	3.8	6.8	11.8	9.8	4.1	
Overall (N=15)	Mean	59	50	71	20	15	19	61	18	23
	SD	3.0	2.2	3.7	1.4	0.96	1.1	9.0	2.5	2.9
	CV%	5.1	4.4	5.2	6.8	6.4	6.1	14.8	13.6	12.7

* Δ Di-4S,6S: These disaccharides were produced from DS and HS(6S).

【0040】

10

20

30

40

50

三種類のコントロール血漿を1日間、N = 5で測定した結果を表6及び表7に示す。

【0041】

【表6】

	Replicates	MSD			DSD		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	n1	0.40	0.32	0.34	0.12	0.13	0.11
	n2	0.38	0.34	0.38	0.12	0.12	0.11
	n3	0.35	0.32	0.33	0.12	0.12	0.10
	n4	0.37	0.33	0.30	0.12	0.12	0.095
	n5	0.37	0.33	0.33	0.11	0.12	0.11
	Mean	0.37	0.33	0.34	0.12	0.12	0.11
	SD	0.018	0.008	0.029	0.0045	0.0045	0.0071
	CV%	4.9	2.6	8.6	3.8	3.7	6.7

10

【0042】

【表7】

	Replicates	$\Delta\text{DiHS-OS}$			$\Delta\text{DiHS-NS}$			$\Delta\text{Di-4S,-6S}^*$		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	n1	91	64	53	13	14	12	54	140	90
	n2	110	67	52	13	14	12	55	180	130
	n3	100	58	50	15	11	12	55	170	91
	n4	96	54	47	15	13	13	55	170	97
	n5	83	53	53	15	14	12	68	180	130
	Mean	96	59	51	14	13	12	57	168	108
	SD	10.1	6.1	2.5	1.1	1.3	0.4	5.9	16.4	20.6
	CV%	10.5	10.4	5.0	7.7	9.9	3.7	10.4	9.8	19.2

* $\Delta\text{Di-4S,6S}$: These disaccharides were produced from DS and HS(6S).

20

【0043】

表5及び表7内に示される Di-4S, 6S濃度は、DS由来の Di-4SとHS由来の DiHS-6Sの総濃度である。

【0044】

表4～表7から明らかな通り、本法が精度の高い分析方法であることが示された。

30

【0045】

ムコ多糖症の患者血漿とコントロール血漿の測定結果を表8及び表9に示す。

【0046】

【表 8】

Sample No.	Category	Age (years)	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)			Composition (%)		
			MSD	DSD	Total	MSD	DSD	
1	MPS I	1.2	3.1	0.50	3.6	86	14	
2	MPS I	0.1	4.6	1.0	5.6	82	18	
3	MPS II	15	4.0	0.76	4.8	84	16	
4	MPS II	19	4.5	0.86	5.4	84	16	
5	MPS II	19	5.0	1.3	6.3	79	21	
6	MPS IIIA	4.5	2.4	0.72	3.1	77	23	10
7	MPS IIIA	0.7	2.6	0.51	3.1	84	16	
8	MPS IIIB	4.5	2.2	0.40	2.6	85	15	
9	MPS IIIB	6.5	2.4	0.80	3.2	75	25	
10	MPS IIIC	6	3.0	0.83	3.8	78	22	
11	MPS IV	3.3	7.0	2.4	9.4	74	26	
12	MPS IV	3.5	3.7	1.1	4.8	77	23	
13	MPS VI	NA	1.9	0.32	2.2	86	14	
14	MPS VI	6.7	4.0	1.3	5.3	75	25	
15	MPS VII	7	1.3	0.28	1.6	82	18	
16	MPS VII	0.5	2.6	0.63	3.2	80	20	20
17	Control	43	0.76	0.16	0.92	83	17	
18	Control	14	0.96	0.22	1.2	81	19	
19	Control	51	0.89	0.29	1.2	75	25	
20	Control	30	0.60	0.18	0.78	77	23	
21	Control	34	0.76	0.26	1.0	75	25	
22	Control	12	2.2	0.45	2.7	83	17	
23	Control	4	1.1	0.36	1.5	75	25	
24	Control	1	1.8	0.36	2.2	83	17	
25	Control	14	2.2	0.71	2.9	76	24	
26	Control	23	0.46	0.13	0.59	78	22	30
27	Control	26	0.73	0.21	0.94	78	22	
28	Control	31	0.43	0.13	0.56	77	23	
29	Control	36	1.6	0.38	2.0	81	19	

NA: Not available.

【 0 0 4 7 】

【表 9】

Sample No.	Category	Age (years)	Concentrations (ng/mL)				Composition (%)		
			Δ DiHS-0S	Δ DiHS-NS	Δ Di-4S,-6S*	Total	Δ DiHS-0S	Δ DiHS-NS	Δ Di-4S,-6S*
1	MPS I	1.2	1200	250	590	2040	59	12	29
2	MPS I	0.1	8500	3300	12000	23800	36	14	50
3	MPS II	15	850	190	230	1270	67	15	18
4	MPS II	19	670	160	320	1150	58	14	28
5	MPS II	19	1100	270	1800	3170	35	9	57
6	MPS IIIA	4.5	1400	320	68	1788	78	18	4
7	MPS IIIA	0.7	2900	590	640	4130	70	14	15
8	MPS IIIB	4.5	1200	270	61	1531	78	18	4
9	MPS IIIB	6.5	2600	770	530	3900	67	20	14
10	MPS IIIC	6	1200	280	470	1950	62	14	24
11	MPS IV	3.3	520	90	700	1310	40	7	53
12	MPS IV	3.5	360	59	780	1199	30	5	65
13	MPS VI	NA	340	73	590	1003	34	7	59
14	MPS VI	6.7	340	62	1400	1802	19	3	78
15	MPS VII	7	210	19	33	262	80	7	13
16	MPS VII	0.5	980	180	700	1860	53	10	38
17	Control	43	120	20	88	228	53	9	39
18	Control	14	130	23	240	393	33	6	61
19	Control	51	120	24	260	404	30	6	64
20	Control	30	130	26	260	416	31	6	63
21	Control	34	130	24	260	414	31	6	63
22	Control	12	150	25	170	345	43	7	49
23	Control	1	290	46	320	656	44	7	49
24	Control	14	350	55	350	755	46	7	46
25	Control	31	220	22	69	311	71	7	22
26	Control	36	470	78	340	888	53	9	38

* Δ Di-4S,6S: These disaccharides were produced from DS and HS(6S).
NA: Not available.

【0048】

表 8 及び表 9 から明らかな通り、本法により臨床試料の測定が可能であり、スクリーニングに適用可能であることが示された。特にムコ多糖症の I V 型（表 8 内 No. 11）で K S 濃度の高値が示された。またムコ多糖症の I、II、III 型（表 9 内 No. 1~10）で H S 由来の Δ DiHS-0S 及び Δ DiHS-NS 濃度の高値が示された。さらにムコ多糖症の VI 型（表 9 内 No. 14）で D S 由来の Δ Di-4S,6S 濃度の高値が示された。

【0049】

高濃度が示された Δ Di-4S,6S レベルは、D S あるいは H S の高値を示す。しかし Δ Di-4S,6S の二糖組成比率が高い場合、 Δ Di-4S,6S の高値は D S の高値を反映する。すなわち各二糖濃度と組成比率を解析できる本法は、詳細な解析をする上で大変有用であることがわかった。

【0050】

以上の結果より、本法は K S、H S 及び D S レベルを一斉に分析することが可能である。今後さらに、患者の年齢、症状と K S、H S 及び D S 濃度の関係を調べることで、1 回の測定でムコ多糖症の各疾患の判別鑑定が可能と考えられた。

【0051】

（実施例 2）

本発明のアッセイ法により尿を用いたスクリーニングが可能か否かを調べるため、ムコ多糖症の患者尿とヒトのコントロール尿を用いて、以下の実験を行なった。

【 0 0 5 2 】

尿試料の前処理方法：1) ULTRAFREE™ - MC (BIOMAX - 5) へ 0.01 mL の尿試料を添加する。2) 4,000 x g、15 分間の条件で遠心する。3) ULTRAFREE™ - MC (BIOMAX - 5) のコレクションチューブを新規のチューブに交換する。4) コンドロシン (生化学工業 (株) 製造、販売) の 50 µg / mL 水溶液を内部標準物質として 0.02 mL をフィルター上へ添加する。5) 0.02 mL の 50 mmol / L Tris - HCl 緩衝液 (pH 7) をフィルター上へ添加する。6) ケラターゼ II、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼ B を各 2 mU を含む酵素混合水溶液の 0.02 mL をフィルター上へ添加する。7) 約 10 秒間、ボルテックミキサーにより混合する。8) 37 °C で 15 時間、インキュベートで加温する。9) 8,000 x g、15 分間の条件で遠心する。10) 濾過液に 0.02 mL の水を添加する。11) 約 10 秒間、ボルテックミキサーにより混合する。12) 試料液をオートサンプラー用注入バイアルへ移す。

10

【 0 0 5 3 】

検量線試料の前処理方法：1) KS 標準溶液は KS (ウシ角膜由来) (生化学工業 (株) 製造、販売) を用いて表 10 に示す濃度で作成する。2) HS 標準溶液として、不飽和ヘパラン / ヘパリン - 二糖キット (H キット) (生化学工業 (株) 製造、販売) を使用し、DiHS - 0S、DiHS - 6S 及び DiHS - NS を含む水溶液を表 11 に示す濃度で作成する。3) ULTRAFREE™ - MC (BIOMAX - 5) へ 0.01 mL の KS 及び 0.02 mL の HS 標準溶液を添加する。4) コンドロシン (生化学工業 (株) 製造、販売) の 50 µg / mL 水溶液を内部標準物質として 0.02 mL をフィルター上へ添加する。5) 0.02 mL の 50 mmol / L Tris - HCl 緩衝液 (pH 7) をフィルター上へ添加する。6) ケラターゼ II、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼ B を各 2 mU を含む酵素混合水溶液の 0.02 mL をフィルター上へ添加する。7) 約 10 秒間、ボルテックミキサーにより混合する。8) 37 °C で 15 時間、インキュベートで加温する。9) 8,000 x g、15 分間の条件で遠心する。10) ブランク尿を固相抽出カラムである Bond Elute SAX column (500 mg / 3 mL) に素通りさせて、ブランク溶液を作成する。11) 0.01 mL のブランク溶液を 9) で得られた濾過液に添加する。12) 約 10 秒間、ボルテックミキサーにより混合する。13) 試料液をオートサンプラー用注入バイアルへ移す。

20

30

【 0 0 5 4 】

【表 10】

標準溶液濃度 (KS)	(Unit: µg/mL)						
	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
MSD	7.1	3.6	2.8	1.4	0.71	0.36	0.14
DSD	2.9	1.5	1.2	0.58	0.29	0.15	0.058
Total	10	5	4	2	1	0.5	0.2

【 0 0 5 5 】

【表 11】

標準溶液濃度 (HS)	(Unit: ng/mL)					
	S6	S5	S4	S3	S2	S1
ΔDiHS-0S	2500	1250	500	250	100	50
ΔDiHS-NS	1250	625	250	125	50	25
ΔDiHS-6S	625	313	125	63	25	13

40

【 0 0 5 6 】

尿試料の分析に関し、LC / MS / MS 条件と濃度算出方法は血漿及び血清の分析時と

50

同じ方法で行なった。

三種類のコントロール尿を3日間、N = 5で測定した結果を表12及び表13に示す。

【 0 0 5 7 】

【表12】

	Replicates	MSD			DSD		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Batch 1	n1	1.3	0.97	1.5	0.65	0.47	0.98
	n2	1.1	1.1	1.5	0.54	0.52	0.98
	n3	1.2	1.1	1.6	0.62	0.49	0.96
	n4	1.2	1.0	1.5	0.58	0.50	0.94
	n5	1.2	1.1	1.6	0.62	0.50	1.1
	Mean	1.2	1.1	1.5	0.60	0.50	1.0
	SD	0.071	0.064	0.055	0.043	0.018	0.063
	CV%	5.9	6.1	3.6	7.1	3.7	6.3
Batch 2	n1	1.3	1.1	1.6	0.63	0.50	1.0
	n2	1.3	1.1	1.6	0.72	0.50	1.1
	n3	1.2	1.2	1.6	0.55	0.52	1.1
	n4	1.3	1.1	1.6	0.66	0.49	1.0
	n5	1.2	1.2	1.6	0.54	0.53	1.1
	Mean	1.3	1.1	1.6	0.62	0.51	1.1
	SD	0.055	0.055	0.000	0.076	0.016	0.055
	CV%	4.3	4.8	0.0	12.2	3.2	5.2
Batch 3	n1	1.4	1.2	1.8	0.65	0.47	1.0
	n2	1.5	1.2	1.8	0.71	0.47	1.1
	n3	1.4	1.3	1.8	0.51	0.54	1.1
	n4	1.5	1.2	1.8	0.66	0.49	1.0
	n5	1.3	1.2	1.9	0.52	0.52	1.1
	Mean	1.4	1.2	1.8	0.61	0.50	1.1
	SD	0.084	0.045	0.045	0.090	0.031	0.055
	CV%	5.9	3.7	2.5	14.7	6.3	5.2
Overall (N=15)	Mean	1.3	1.1	1.7	0.61	0.50	1.0
	SD	0.12	0.087	0.13	0.067	0.022	0.063
	CV%	9.0	7.6	7.9	11.0	4.4	6.0

10

20

【 0 0 5 8 】

【表 1 3】

Replicates	Δ DiHS-OS			Δ DiHS-NS			Δ Di-4S,6S*			
	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3	
Batch 1	n1	1100	880	1800	430	340	1100	3100	2000	6100
	n2	900	920	1900	350	370	1100	2400	2200	6700
	n3	980	890	1800	450	370	1100	2900	2200	7000
	n4	1000	890	1800	410	350	1100	3100	2100	6300
	n5	1000	880	1800	450	360	1100	3100	2200	6900
	Mean	996	892	1820	418	358	1100	2920	2140	6600
SD	71	16	45	41	13	0	303	89	387	
CV%	7.2	1.8	2.5	9.9	3.6	0.0	10.4	4.2	5.9	
Batch 2	n1	990	810	1800	450	330	980	3200	2300	6400
	n2	1100	820	1800	490	330	1000	2900	2200	6600
	n3	890	930	1900	410	360	1100	3000	2400	6300
	n4	1000	790	1800	460	310	1000	3100	2100	6500
	n5	900	910	1800	420	330	1000	2900	2300	6300
	Mean	976	852	1820	446	332	1016	3020	2260	6420
SD	86	63	45	32	18	48	130	114	130	
CV%	8.8	7.4	2.5	7.2	5.4	4.7	4.3	5.0	2.0	
Batch 3	n1	1100	990	2000	460	350	1100	3100	2300	6500
	n2	1200	830	2000	500	360	1100	3200	2000	6900
	n3	890	810	2000	390	390	1200	2600	2600	6500
	n4	1100	940	1900	480	340	1100	3300	2000	7000
	n5	990	790	2000	420	330	1100	2800	2300	6400
	Mean	1056	872	1980	450	354	1120	3000	2240	6660
SD	119	88	45	45	23	45	292	251	270	
CV%	11.3	10.1	2.3	9.9	6.5	4.0	9.7	11.2	4.1	
Overall (N=15)	Mean	1009	872	1873	438	348	1079	2980	2213	6560
	SD	94	61	88	40	21	58	240	164	282
	CV%	9.3	7.0	4.7	9.1	6.0	5.4	8.0	7.4	4.3

* Δ Di-4S,6S: These disaccharides were produced from DS and HS(6S).

【 0 0 5 9 】

表 1 2 及び表 1 3 から明らかな通り、本法が精度の高い分析方法であることが示された。

【 0 0 6 0 】

ムコ多糖症の患者尿とコントロール尿の測定結果を表 1 4 及び表 1 5 に示す。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

【表 1 4】

Sample No.	Data	Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine)			Composition (%)		Creatinine (mg/mL)
		MSD	DSD	Total	MSD	DSD	
1	MPS I	21	5.1	26	80	20	0.1324
2	MPS I	14	3.5	17	79	21	0.244
3	MPS I	5.1	1.1	6.3	82	18	0.107
4	MPS II	11	3.5	14	75	25	0.111
5	MPS II	12	3.9	16	76	24	0.633
6	MPS II	2.3	0.91	3.2	71	29	0.836
7	MPS IIIA	38	10	48	80	20	0.0288
8	MPS IIIA	8.7	2.8	12	75	25	0.172
9	MPS IIIA	22	6.5	29	77	23	0.054
10	MPS IIIB	14	4.7	19	75	25	0.188
11	MPS IIIB	7.2	2.6	9.8	74	26	0.47
12	MPS IIIB	79	61	140	56	44	0.105
13	MPS IIIC	5.2	2.4	7.6	69	31	0.463
14	MPS IIIC	2.1	1.0	3.1	67	33	0.765
15	MPS IIIC	30	6.1	37	83	17	0.493
16	MPS IVA	19	18	37	50	50	0.468
17	MPS IVA	4.2	3.2	7.4	57	43	0.688
18	MPS IVA	13	12	25	51	49	1.38
19	MPS IVB	37	13	50	74	26	0.105
20	MPS IVB	6.1	2.6	8.8	70	30	0.797
21	MPS IVB	15	4.8	20	76	24	0.2711
22	MPS VI	4.5	3.3	7.8	58	42	0.799
23	MPS VI	4.3	1.9	6.2	69	31	0.304
24	MPS VI	3.9	2.3	6.1	63	37	0.618
25	MPS VII	2.8	0.88	3.7	76	24	0.193
26	MPS VII	22	8.8	30	71	29	0.694
27	MPS VII	1.9	0.74	2.7	72	28	0.43
28	Adult control 1	0.63	0.27	0.90	70	30	1.0319
29	Adult control 2	0.53	0.37	0.89	59	41	2.2735
30	Adult control 3	0.46	0.19	0.65	71	29	1.9874
31	Adult control 4	0.52	0.24	0.76	69	31	2.1103
32	Adult control 5	1.0	0.34	1.3	74	26	0.7045
33	Adult control 6	0.28	0.15	0.43	64	36	3.1815
34	Adult control 7	0.44	0.25	0.69	64	36	2.0811
35	Adult control 8	0.49	0.27	0.76	65	35	2.0401
36	Adult control 9	0.49	0.22	0.71	69	31	1.9045
37	Adult control 10	0.72	0.23	1.0	76	24	1.3672
38	Adult control 11	0.53	0.35	0.88	60	40	2.6606
39	Adult control 12	0.47	0.30	0.77	61	39	1.7903

【 0 0 6 2 】

【表 15】

Sample No.	Data	Concentrations (ng/mg creatinine)				Composition (%)			Creatinine (mg/mL)
		ΔDiHS-0S	ΔDiHS-NS	ΔDi-4S,-6S*	Total	ΔDiHS-0S	ΔDiHS-NS	ΔDi-4S,-6S*	
1	MPS I	110000	23000	580000	713000	15	3	81	0.1324
2	MPS I	98000	30000	980000	1108000	9	3	88	0.244
3	MPS I	15000	3100	41000	59100	25	5	69	0.107
4	MPS II	70000	13000	200000	283000	25	5	71	0.111
5	MPS II	63000	25000	440000	528000	12	5	83	0.633
6	MPS II	950	400	2600	3950	24	10	66	0.836
7	MPS IIIA	330000	66000	32000	428000	77	15	7	0.0288
8	MPS IIIA	110000	21000	18000	149000	74	14	12	0.172
9	MPS IIIA	240000	48000	35000	323000	74	15	11	0.054
10	MPS IIIB	170000	53000	32000	255000	67	21	13	0.188
11	MPS IIIB	110000	36000	26000	172000	64	21	15	0.47
12	MPS IIIB	260000	130000	2800000	3190000	8	4	88	0.105
13	MPS IIIC	63000	20000	19000	102000	62	20	19	0.463
14	MPS IIIC	30000	8400	5500	43900	68	19	13	0.765
15	MPS IIIC	3200	1300	5300	9800	33	13	54	0.493
16	MPS IVA	1400	750	19000	21150	7	4	90	0.468
17	MPS IVA	550	200	2900	3650	15	5	79	0.688
18	MPS IVA	1600	1000	15000	17600	9	6	85	1.38
19	MPS IVB	2200	760	4200	7160	31	11	59	0.105
20	MPS IVB	650	340	1300	2290	28	15	57	0.797
21	MPS IVB	1800	700	5500	8000	23	9	69	0.2711
22	MPS VI	2100	1000	160000	163100	1	1	98	0.799
23	MPS VI	1700	630	110000	112330	2	1	98	0.304
24	MPS VI	1900	940	140000	142840	1	1	98	0.618
25	MPS VII	470	140	980	1590	30	9	62	0.193
26	MPS VII	45000	20000	190000	255000	18	8	75	0.694
27	MPS VII	7000	1800	8100	16900	41	11	48	0.43
28	Adult control 1	510	190	610	1310	39	15	47	1.0319
29	Adult control 2	700	290	1100	2090	33	14	53	2.2735
30	Adult control 3	440	170	650	1260	35	13	52	1.9874
31	Adult control 4	440	150	900	1490	30	10	60	2.1103
32	Adult control 5	540	170	1200	1910	28	9	63	0.7045
33	Adult control 6	310	140	690	1140	27	12	61	3.1815
34	Adult control 7	430	160	720	1310	33	12	55	2.0811
35	Adult control 8	540	230	1200	1970	27	12	61	2.0401
36	Adult control 9	450	170	840	1460	31	12	58	1.9045
37	Adult control 10	370	130	700	1200	31	11	58	1.3672
38	Adult control 11	750	380	1900	3030	25	13	63	2.6606
39	Adult control 12	530	200	610	1340	40	15	46	1.7903

*ΔDi-4S,6S: These disaccharides were produced from DS and HS(6S).

【0063】

表14及び表15から明らかな通り、本法により臨床試料の測定が可能であり、スクリーニングに適用可能であることが示された。特にムコ多糖症のI、II、III型でHS濃度の高値が、ムコ多糖症のVI型でDi-4S,6S濃度が高値を示した。

特にムコ多糖症IV A型(表14内No.16~18)とIV B型(表14内No.19~21)ではKS由来のDSD比率が異なる。すなわちIV A型ではDSDの高い比率が示された。従って組成比率を解析することで、IV A型とIV B型を区別することが可能である。

【0064】

以上の結果より、本法はKS、HS及びDSレベルを一斉に分析することが可能である。今後さらに、患者の年齢、症状とKS、HS及びDS濃度の関係を調べることで、1回の測定でムコ多糖症の各疾患の判別鑑定が可能と考えられた。

【図面の簡単な説明】

【0065】

10

20

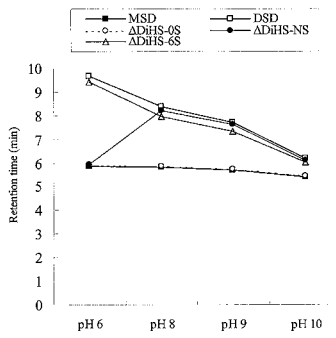
30

40

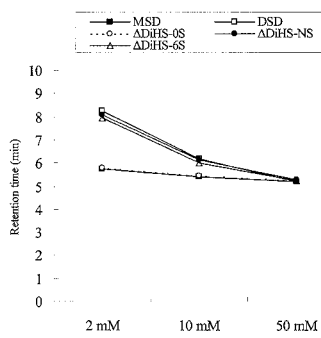
50

- 【図1】移動相 pH と溶出位置の関係を示す図である。
- 【図2】移動相の塩濃度と溶出位置の関係を示す図である。
- 【図3】移動相 pH のピーク形状と分離への影響を示す図である。

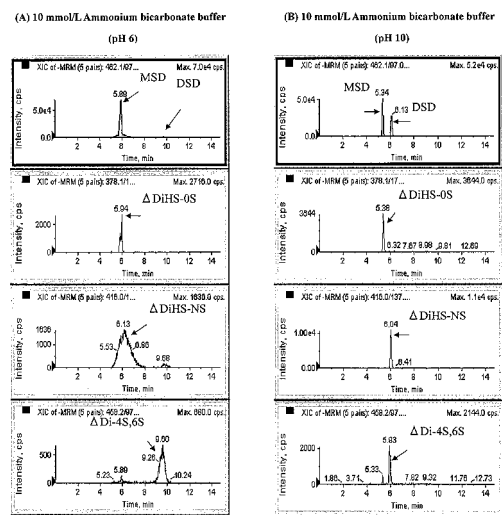
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 30/26 (2006.01) C 1 2 Q 1/34
 G 0 1 N 30/88 1 0 1 J
 G 0 1 N 30/26 A

(74)代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄

(74)代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫

(74)代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

(74)代理人 100101317
 弁理士 的場 ひろみ

(74)代理人 100121153
 弁理士 守屋 嘉高

(74)代理人 100134935
 弁理士 大野 詩木

(74)代理人 100130683
 弁理士 松田 政広

(74)代理人 100140497
 弁理士 野中 信宏

(72)発明者 戸松 俊治
 アメリカ合衆国 6 3 1 1 0 - 2 5 1 2 ミズーリ, セントルイス, パークアベニュー 3 6 6 2 ,
 セントルイス ユニバーシティ デパートメント オブ ペディアトリックス, ペディアトリック
 リサーチ インスティテュート

(72)発明者 小熊 敏弘
 東京都江戸川区北葛西1丁目16-13 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開2003-265196(JP, A)
 国際公開第2005/090411(WO, A1)
 特開平04-135496(JP, A)
 特表2000-502062(JP, A)
 特表2005-530157(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 0 / 0 0 - 3 0 / 9 6