The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	分光法を用いたアルカプトン尿の吸収曲線の解析
Author(s)	徳原, 康哲
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61561
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　徳原　康哲　　）	
論文題名	分光法を用いたアルカプトン尿の吸収曲線の解析

論文内容の要旨

（諸言）

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．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フマル酸および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は暗褐色へと変化する．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．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．

アルカプトン尿の検出法については，尿を空気中に放置し尿の暗褐色化を観察する方法，アルカリ溶液を加え，尿の暗褐色化が促進されるかどうかを観察する方法が従来おこなわれている．しかし，排尿後直ちに尿の暗褐色化は起こらず，多くの患者尿は異常色を呈することがない．

本研究では，アルカリ溶液添加時のアルカプトン尿およびHGAの吸光度変化を可視領域においてそれぞれ測定した．色調変化に伴う吸収曲線の変化を観察し，分光法によるアルカプトン尿症の簡易かつ迅速な検査法の考案をおこなった．

（材料と方法）

アルカプトン尿症2例，フェニルケトン尿症3例，健常者ボランティア5例からそれぞれ採取した尿を本研究に使用した．光路長10 mmのミクロセル中に試料を添加し，U-3310　分光光度計を用いて吸光度を測定した．尿検体750 μLまたは蒸留水に溶解させた0.04% HGA 750 μLに，12.5 μLの1 M 水酸化ナトリウム（NaOH），1 M 水酸化カリウム（KOH），1 M アンモニア水（NH_4OH）をそれぞれ添加しアルカリ化をおこなった．1分，10分，30分，60分と試料をそれぞれ室温放置後，吸光度を測定した．抗酸化物質の影響を観察するために，600 μLの尿検体または0.04% HGAに1 M アスコルビン酸（AA）　150 μLをそれぞれ添加，その後1 M NaOH 12.5 μLを添加し，1分後に吸光度を測定した．750 μLの0.04% 2-ヒドロキシフェニル酢酸または0.04% ゲンチジン酸（GA）に，12.5 μLの1 M NaOHをそれぞれ添加し，1分後に吸光度を測定した．

（結果）

アルカリ溶液添加時のアルカプトン尿の吸光度を測定した結果，406 nm，430 nmに極大をもつ二峰性の吸収曲線が認められた．また，HGAにアルカリ溶液を添加すると，アルカプトン尿と同様に406 nm，430 nmに極大をもつ吸収曲線となった．健常者尿，GA，2－ヒドロキシフェニル酢酸，フェニルケトン尿にNaOHをそれぞれ添加しても吸収曲線は406 nmおよび430 nmに極大を示さなかった．アルカプトン尿およびHGAに強アルカリ溶液（NaOH，KOH）をそれぞれ添加した場合，弱アルカリ溶液（NH_4OH）を添加した場合と比較し，406 nmおよび430 nmの吸光度はともに大きくなり，より明瞭な二峰性の吸収曲線となった．抗酸化剤であるAAを加えたHGAにNaOHを添加し1分後の吸光度を測定した結果，HGAの暗褐色化はみられず，吸収曲線は406 nmおよび430 nmに極大吸収を示さなかった．また，アルカプトン尿症2例から採取した尿においても同様の結果が得られた．

（考察）

今回，アルカプトン尿症の新規スクリーニング検査法考案を目的とし，アルカリ溶液添加時の尿の暗褐色化に伴う吸収曲線の変化を分光法により解析した．その結果，アルカプトン尿，HGAともにアルカリ溶液添加1分後に406 nm，430 nmに吸収極大をもつ特有の吸収曲線を示した．これらの結果は，尿中HGAを検出するための新しい迅速検査法へと発展が期待できるものであり，アルカリ溶液添加後に出現する2つの吸収極大は，アルカプトン尿症の簡易迅速検査法の確立に必要な要素となる．

アルカプトン尿の検出方法の一つとして，尿を自然放置し数時間から数日後に尿の色調が暗褐色に変化するかどうかを観察する方法がある．また，アルカリ溶液添加により尿の暗褐色化が促進されることも広く知られているが，これらの方法は標準化されていない．アルカプトン尿症については，確定診断につながるスクリーニング検査が確立されていないのが現状であり，眼球結膜や耳介への色素沈着や関節炎の手術の際に見つかる等，症状が進行してからの発見が大半である．また，先天性代謝疾患発見のためにおこなわれる新生児マススクリーニング検査において，アルカプトン尿症はその対象となっていない．分光法によるアルカプトン尿症の新規検査法が実現すれば，尿の色調変化を吸収曲線として評価することが可能になるだけでなく，新生児マススクリーニング検査への利用が十分に考えられ，早期発見に非常に有用である．さらに，分光光度計は比較的多くの検査室で設置されており設備投資する必要はなく，その操作法は簡易かつ広く知られているため，NaOH等のアルカリ溶液があれば簡易で迅速な検査が各施設で可能である．

アルカリ溶液添加による2つの吸収極大の出現がHGA特異的なものかどうかを調べるため，フェニルケトン尿，2-ヒドロキシフェニル酢酸，そしてアスピリンの代謝物であるGAについてもアルカリ溶液添加後の吸光度を測定した．HGAは，2-ヒドロキシフェニル酢酸やGAと構造が類似している．さらに，GAはアルカリ溶液添加により暗褐色に色調が変化したことから，アルカリ溶液を添加した場合，406 nm，430 nmに吸収極大を示す可能性があるため，NaOH添加後の吸収曲線を観察した．その結果，GAにNaOHを添加しても406 nm，430 nmに吸収極大はみられなかった．フェニルケトン尿症もアルカプトン尿症と同様に先天性のフェニルアラニン代謝異常症である．病因は，フェニルアラニン代謝経路においてフェニルアラニンをチロシンへと変換するフェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝的欠損であり，フェニルアラニンおよび種々の中間代謝産物（フェニルケトン体）の血中濃度が上昇し，尿中に大量に排出される．フェニルケトン尿症では尿中の2-ヒドロキシフェニル酢酸が増加するため，フェニルケトン尿症の症例から採取した尿にもNaOHを添加し，吸収曲線を観察した．その結果，フェニルケトン尿，2-ヒドロキシフェニル酢酸にNaOHをそれぞれ添加しても406 nm，430 nmに吸収極大はみられなかった．以上の結果から，アルカリ溶液添加時に観察された406 nm，430 nmにおける2つの極大吸収はHGA特異的なものであり，アルカプトン尿症の検査に有用であることが示唆された．

アルカプトン尿症では，AAの影響により尿中のBQAが有意に減少したことや， AAの処方は血漿HGA濃度を減少させるとの報告がされている．今回の検討においても，抗酸化剤であるAAの添加によりHGAおよびアルカプトン尿の暗褐色化が阻害され，さらに406 nm，430 nmの波長における2つの極大吸収も認められなかった．以上の事から，AAを過剰摂取したアルカプトン尿症例では我々が検討した方法は偽陰性を示す可能性がある．

（結論）

本研究では，アルカリ溶液添加によるアルカプトン尿の暗褐色化を分光法により評価した結果，アルカプトン尿，HGAともにアルカリ溶液を添加すると406 nm，430 nmに吸収極大をもつ吸収曲線となった．また，強アルカリ溶液を添加することで，可視光領域における吸収曲線が明確となった．以上のことから，アルカプトン尿に強アルカリ溶液を添加し，その吸収曲線を解析することは迅速かつ簡便なアルカプトン尿症の検査法として有用と考えられる．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　徳原　康哲　　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	稲垣　忍
	副 査	教授	岩谷　良則
	副 査	教授	三善　英知

論文審査の結果の要旨

「博士学位論文内容の要旨」:

（諸言）　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．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フマル酸および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は暗褐色へと変化する．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．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．アルカプトン尿の検出法については，尿を空気中に放置し尿の暗褐色化を観察する方法，アルカリ溶液を加え，尿の暗褐色化が促進されるかどうかを観察する方法が従来おこなわれている．しかし，排尿後直ちに尿の暗褐色化は起こらず，多くの患者尿は異常色を呈することがない．本研究では，アルカリ溶液添加時のアルカプトン尿およびHGAの吸光度変化を可視領域においてそれぞれ測定した．色調変化に伴う吸収曲線の変化を観察し，分光法によるアルカプトン尿症の簡易かつ迅速な検査法の考案をおこなった．

（材料と方法）　アルカプトン尿症2例，フェニルケトン尿症3例，健常者ボランティア5例からそれぞれ採取した尿を本研究に使用した．光路長10 mmのミクロセル中に試料を添加し，U-3310　分光光度計を用いて吸光度を測定した．尿検体750 μLまたは蒸留水に溶解させた0.04% HGA 750 μLに，12.5 μLの1 M 水酸化ナトリウム（NaOH），1 M 水酸化カリウム（KOH），1 M アンモニア水（NH_4OH）をそれぞれ添加しアルカリ化をおこなった．1分，10分，30分，60分と試料をそれぞれ室温放置後，吸光度を測定した．抗酸化物質の影響を観察するために，600 μLの尿検体または0.04% HGAに1 M アスコルビン酸（AA）　150 μLをそれぞれ添加，その後1 M NaOH 12.5 μLを添加し，1分後に吸光度を測定した．750 μLの0.04% 2-ヒドロキシフェニル酢酸または0.04% ゲンチジン酸（GA）に，12.5 μLの1 M NaOHをそれぞれ添加し，1分後に吸光度を測定した．

（結果）　アルカリ溶液添加時のアルカプトン尿の吸光度を測定した結果，406 nm，430 nmに極大をもつ二峰性の吸収曲線が認められた．また，HGAにアルカリ溶液を添加すると，アルカプトン尿と同様に406 nm，430 nmに極大をもつ吸収曲線となった．健常者尿，GA，2－ヒドロキシフェニル酢酸，フェニルケトン尿にNaOHをそれぞれ添加しても吸収曲線は406 nmおよび430 nmに極大を示さなかった．アルカプトン尿およびHGAに強アルカリ溶液（NaOH，KOH）をそれぞれ添加した場合，弱アルカリ溶液（NH_4OH）を添加した場合と比較し，406 nmおよび430 nmの吸光度はともに大きくなり，より明瞭な二峰性の吸収曲線となった．抗酸化剤であるAAを加えたHGAにNaOHを添加し1分後の吸光度を測定した結果，HGAの暗褐色化はみられず，吸収曲線は406 nmおよび430 nmに極大吸収を示さなかった．また，アルカプトン尿症2例から採取した尿においても同様の結果が得られた．

（考察）　今回，アルカプトン尿症の新規スクリーニング検査法考案を目的とし，アルカリ溶液添加時の尿の暗褐色化に伴う吸収曲線の変化を分光法により解析した．その結果，アルカプトン尿，HGAともにアルカリ溶液添加1分後に406 nm，430 nmに吸収極大をもつ特有の吸収曲線を示した．これらの結果は，尿中HGAを検出するための新しい迅速検査法へと発展が期待できるものであり，アルカリ溶液添加後に出現する2つの吸収極大は，アルカプトン尿症の簡易迅速検査法の確立に必要な要素となる．

アルカプトン尿の検出方法の一つとして，尿を自然放置し数時間から数日後に尿の色調が暗褐色に変化するかどうかを観察する方法がある．また，アルカリ溶液添加により尿の暗褐色化が促進されることも広く知られているが，これらの方法は標準化されていない．アルカプトン尿症については，確定診断につながるスクリーニング検査が確立されていないのが現状であり，眼球結膜や耳介への色素沈着や関節炎の手術の際に見つかる等，症状が進行してからの発見が大半である．また，先天性代謝疾患発見のためにおこなわれる新生児マススクリーニング検査において，アルカプトン尿症はその対象となっていない．分光法によるアルカプトン尿症の新規検査法が実現すれば，尿の色調変化を吸収曲線として評価することが可能になるだけでなく，新生児マススクリーニング検査への利用が十分に考えられ，早期発見に非常に有用である．さらに，分光光度計は比較的多くの検査室で設置されており設備投資する必要はなく，その操作法は簡易かつ広く知られているため，NaOH等のアルカリ溶液があれば簡易で迅速な検査が各施設で可能である．

アルカリ溶液添加による2つの吸収極大の出現がHGA特異的なものかどうかを調べるため，フェニルケトン尿，2-ヒドロキシフェニル酢酸，そしてアスピリンの代謝物であるGAについてもアルカリ溶液添加後の吸光度を測定した．HGAは，2-ヒドロキシフェニル酢酸やGAと構造が類似している．さらに，GAはアルカリ溶液添加により暗褐色に色調が変化したことから，アルカリ溶液を添加した場合，406 nm，430 nmに吸収極大を示す可能性があるため，NaOH添加後の吸収曲線を観察した．その結果，GAにNaOHを添加しても406 nm，430 nmに吸収極大はみられなかった．フェニルケトン尿症もアルカプトン尿症と同様に先天性のフェニルアラニン代謝異常症である．病因は，フェニルアラニン代謝経路においてフェニルアラニンをチロシンへと変換するフェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝的欠損であり，フェニルアラニンおよび種々の中間代謝産物（フェニルケトン体）の血中濃度が上昇し，尿中に大量に排出される．フェニルケトン尿症では尿中の2-ヒドロキシフェニル酢酸が増加するため，フェニルケトン尿症の症例から採取した尿にもNaOHを添加し，吸収曲線を観察した．その結果，フェニルケトン尿，2-ヒドロキシフェニル酢酸にNaOHをそれぞれ添加しても406 nm，430 nmに吸収極大はみられなかった．以上の結果から，アルカリ溶液添加時に観察された406 nm，430 nmにおける2つの極大吸収はHGA特異的なものであり，アルカプトン尿症の検査に有用であることが示唆された．

アルカプトン尿症では，AAの影響により尿中のBQAが有意に減少したことや，　AAの処方は血漿HGA濃度を減少させるとの報告がされている．今回の検討においても，抗酸化剤であるAAの添加によりHGAおよびアルカプトン尿の暗褐色化が阻害され，さらに406 nm，430 nmの波長における2つの極大吸収も認められなかった．以上の事から，AAを過剰摂取したアルカプトン尿症例では我々が検討した方法は偽陰性を示す可能性がある．

（結論）本研究では，アルカリ溶液添加によるアルカプトン尿の暗褐色化を分光法により評価した結果，アルカプトン尿，HGAともにアルカリ溶液を添加すると406 nm，430 nmに吸収極大をもつ吸収曲線となった．また，強アルカリ溶液を添加することで，可視光領域における吸収曲線が明確となった．以上のことから，アルカプトン尿に強アルカリ溶液を添加し，その吸収曲線を解析することは迅速かつ簡便なアルカプトン尿症の検査法として有用と考えられる．

「審査結果の要旨」：論文を審査した結果、博士（保健学）の学位を授与する価値があると認定。