

[原著]

## 偽痛風診断への応用を目的とした ピロリン酸カルシウム測定の基礎的検討

福永佳緒莉 上田翔平 菊池 亮  
大川原正 安楽健作

Fundamental study of calcium pyrophosphate measurement relevant to Pseudogout diagnosis

Kaori FUKUNAGA, Syohei UEDA, Makoto KIKUCHI,  
Tadashi OKAWARA, Kensaku ANRAKU

偽痛風とはピロリン酸カルシウム (CPPD) 結晶が関節内に沈着することで痛みを引き起こす急性関節炎である。現在関節液中の CPPD 結晶を偏光顕微鏡で観察する方法や、X 線撮影で関節軟骨石灰化を確認することで診断されている。しかし、症状によってはこれらの検査での診断が困難な場合がある。そこで、ピロリン酸カルシウムの定量法の開発を目的として、硫酸でピロリン酸カルシウム中のピロリン酸をモノリン酸とし、本法をもとにリン酸濃度の測定を行う方法を考案した。また、ピロリン酸測定キットを使用し、モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの2種類の測定法における定量値の比較を行い、良い相関を得た。さらに本法は、感度ならびに再現性ともに良好であり、臨床検査への応用の可能性が示された。

キーワード：偽痛風，ピロリン酸カルシウム，モリブデンブルー法

### I. 緒 言

偽痛風 (ピロリン酸カルシウム血症沈着症) は、Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) の結晶が関節内に沈着することにより引き起こされ、発赤、腫脹を伴う急性関節炎を呈する疾患である<sup>1)</sup>。我が国での頻度は70歳代6.0%、80歳代13.6%、90歳以上40%と報告されている<sup>2)</sup>。現在関節液中の CPPD 結晶を偏光顕微鏡で観察する方法や、X 線撮影で関節軟骨石灰化を確認することで診断されている<sup>1)</sup>。しかし、症例によっては CPPD の結晶化がみられないものや、典型的な結晶形態を示さないため同定できない、さらには X 線撮影での確認が困難なことも少なくない。

本研究はこの偽痛風を引き起こす関節液中のピロリン酸カルシウムに着目し、その定量測定法を新たに考案することを目的とした。すなわち、硫酸を用いてピロリン酸カルシウムから、カルシウムを解離

させるとともにピロリン酸をモノリン酸に誘導し、モリブデンブルー法<sup>3), 4)</sup>により定量できれば、偽痛風の診断に応用できると考えた。そこで、はじめに難溶性である市販のピロリン酸カルシウムを用いて、モノリン酸の定量における測定条件の検討を行った。また関節液の模擬検体として市販のサプリメントを使用し、関節成分が存在する場合と、しない場合とでモリブデンブルー法をもとにした吸光度に変化が起きるかどうかの検討を行った。一方で、関節液のピロリン酸カルシウム量と遊離ピロリン酸量との関係を把握するためには、遊離ピロリン酸の測定が必要となる。そこで、O'Brien らが開発したピロリン酸測定キット<sup>5)</sup>を使用し、モリブデンブルー法により求めたモノリン酸とピロリン酸キットより求めた遊離ピロリン酸とのリン酸量における相関を確認した。さらに、モリブデンブルー法ならびにピロリン酸測定キットにおける同時再現性、日差再現性を測定することで、臨床検査への応用が可能

であるかどうかの考察を行った。

## Ⅱ. 方 法

### 1. 試薬ならびに機器

本実験に使用した試薬ならびに機器を以下の表1に示す。

### 2. モリブデンブルー法

モリブデンブルー法の常法<sup>4)</sup>をもとにして以下の手順(表2)で測定を行った。

### 3. ピロリン酸測定キット

O'Brien ら<sup>5)</sup>が開発したピロリン酸測定キット

(SIGMA P7275)を使用し測定した。

図1に示すように、結果として生成するジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)の総量をNADH存在下、グリセロリン酸デヒドロゲナーゼを作用させることで340 nmにおける吸光度の減少量を測定した。反応は30℃にて行い、日立レシオビーム分光光度計(U-5100)を用いて測定した。なお、ピロリン酸測定キットの検出範囲は200~2000 nmol/mlである。

### 4. モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関に関する実験

モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関に関する実験においては、0.3 mol/lピロリン

表1. 試薬ならびに機器

試薬		
七モリブデン酸六アンモニウム四水和物	精密分析用	和光純薬工業
酒石酸アンチモン(III)	試薬特級	〃
硫酸	〃	〃
L-アスコルビン酸	〃	〃
ピロリン酸カルシウム	鹿1級	関東化学
ピロリン酸ナトリウム	〃	〃
四季潤(関節液模擬成分)		ワダカルシウム製薬
ピロリン酸測定キット		SIGMA
機器		
日立分光光度計(7011型)		可視光分析用
日立レシオビーム分光光度計(U-5100)		紫外・可視光分析用

表2. モリブデンブルー法操作手順

1) ピロリン酸カルシウムを0.2541 g量り、5 mol/l 硫酸100 mlで溶解 <sup>a)</sup>	↓	6) 100 ml 三角フラスコに移し、モリブデン酸アンモニウム溶液 <sup>b)</sup> を1.0 ml加えよく混和
↓	↓	↓
2) マグネチックスターラーを用いて80℃で30分間攪拌	↓	7) L-アスコルビン酸溶液 <sup>c)</sup> を0.25 ml加えよく混和
↓	↓	↓
3) ろ過した後、200 ml メスフラスコに移して5 mol/l 硫酸でメスアップ	↓	8) 暗所で20分間静置
↓	↓	↓
4) 精製水で50倍希釈	↓	9) 7011形分光光度計を使用して、880 nm, 25℃の条件で吸光度を測定
↓		
5) 0 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml ずつ25 ml メスフラスコに入れ精製水でメスアップ		

a) ピロリン酸測定キットの標準液がピロリン酸ナトリウムであるため、ピロリン酸ナトリウムにおいても同様の測定を行った。ピロリン酸カルシウム0.2541 gに含まれるピロリン酸と同量になるように、ピロリン酸ナトリウムは0.2661 gを使用した。b) 七モリブデン酸六アンモニウム四水和物1.2 gと酒石酸アンチモン(III)カリウム三水和物0.048 gを精製水60mlに溶解し、9 mol/l硫酸を32 ml加え精製水で全量を100 mlとし、モリブデンアンモニウム溶液とした。c) L-アスコルビン酸溶液は、L-アスコルビン酸3.6 gを精製水50 mlに溶解することで作製した。

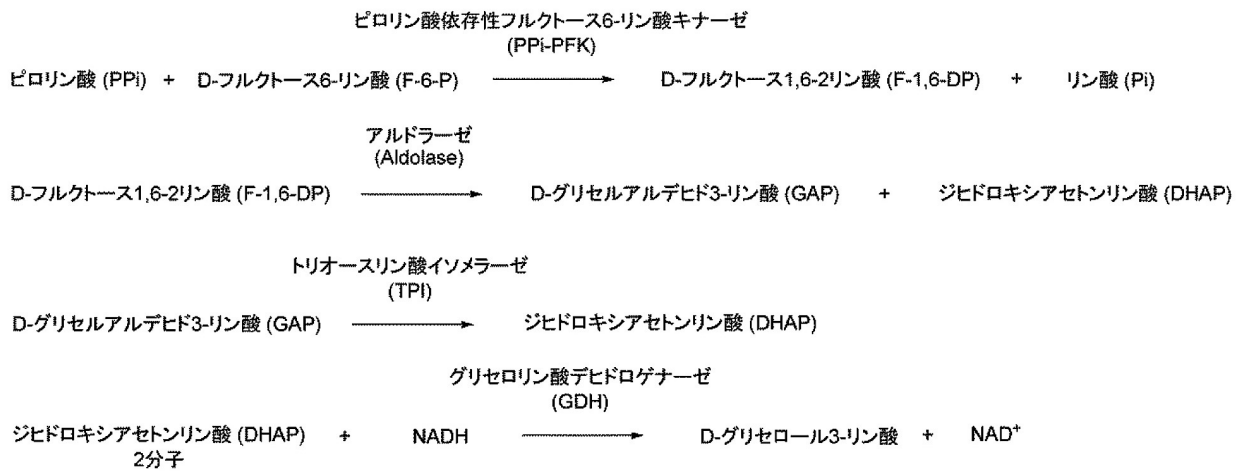


図1. ピロリン酸測定キット反応原理

酸ナトリウム水溶液を調製した。ピロリン酸ナトリウムを7.623 g 量り精製水100 mlで溶解し、マグネチックスターラーを用いて80℃で30分間攪拌した。ろ過した後、精製水で全量を100 mlとした。モリブデンブルー法において方法1をもとに以下

の手順（表3）で測定を行った。

ピロリン酸測定キットにおいては方法3をもとに以下の手順（表4）で測定を行った。

表3. モリブデンブルー法操作手順

1) 0.3 mol/lの溶液を3.39 ml取り5 mol/l硫酸を用いて200 mlメスフラスコでメスアップ	6) 100 ml三角メスフラスコに移し、モリブデン酸アンモニウム溶液を1.0 ml加えよく混和
↓	↓
2) 2 ml取り100 mlメスフラスコに入れ、精製水でメスアップ	7) L-アスコルビン酸溶液を0.25 ml加えよく混和
↓	↓
3) 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mlずつ25 mlメスフラスコに入れ、精製水でメスアップし希釈系列を作成	8) 暗所で20分間静置
↓	↓
	9) U-1500形分光光度計を使用して、880 nm, 25℃の条件で吸光度を測定

表4. ピロリン酸測定キット操作手順

1) 0.3 mol/lの溶液を3.39 ml取り5 mol/l精製水を用いて200 mlメスフラスコでメスアップ	↓
↓	4) 転倒混和後、30℃で10分間加温し、吸光度が約1.500であることを確認
2) 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mlずつ25 mlメスフラスコに入れ、精製水でメスアップし希釈系列を作成	↓
↓	5) 石英セルへ0.05 mlのそれぞれの標準液系列を加え、転倒混和後30℃で10分間加温
3) ピロリン酸測定用試薬調製済みバイアルを4.0 ml精製水で溶解後石英セルに1.0 ml移し、さらに精製水を1.95 ml加えた	↓
	6) 吸光度減少を10分間測定し、式 <sup>a)</sup> よりピロリン酸濃度 (mmol/ml) を算出した。

a)  $\{(\Delta A_{TEST} - \Delta A_{BLANK}) \times 3\} / 6.22 \times 2 \times 0.05$ ;  $\Delta A_{TEST} = \text{Initial } A_{340} \text{ Test} - \text{Final } A_{340} \text{ Test}$ ,  $\Delta A_{BLANK} = \text{Initial } A_{340} \text{ Blank} - \text{Final } A_{340} \text{ Blank}$ , 3 = 反応体積 (ml), 6.22 = ミリモル吸光係数 (l/mmol · cm), 2 = NADH 消費モル数, 0.05 = サンプルの体積 (ml) なお、キット法との相関を見るためにモリブデンブルー法においては吸光度及び1/2の吸光度を算出した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1. モリブデンブルー法を用いたピロリン酸カルシウムならびにピロリン酸ナトリウムの測定

方法1. に基づいてピロリン酸カルシウム（表5, 図2）とピロリン酸ナトリウム（表6, 図3）の希釈系列における吸光度ならびに検量線を作成した。吸光度は0.100~1.000を示し、ピロリン酸カルシウム濃度に比例して吸光度が上昇する結果を得た。本結果より、方法1に基づいて測定を行えば、ピロリン酸カルシウム、ピロリン酸ナトリウム両方において同等の結果が得られることが確認できた。

#### 2. 関節液成分の影響の有無

モリブデンブルー法で関節液を測定する際に、関節液成分の影響を確認するために、ワダカルシウム製薬株式会社より購入した四季潤を1錠加えることで関節液類似液とし測定を行った。なお、1錠(0.355 g) 当たりにはヒアルロン酸12.5 mg, コンドロイチン硫酸12.5 mg, グルコサミン塩酸塩187.5 mg, コラーゲン25 mg, 他にはナトリウム, 脂質, タンパク質が含まれている。一般に、関節

液には1.5~4.0 mg/mlのヒアルロン酸が含まれていることから、ヒアルロン酸量をもとに10倍程度の関節液成分が含まれていると仮定した<sup>6)</sup>。そこで、ピロリン酸カルシウム0.2541 gとサプリメント1錠をすり潰したものを5 mol/l硫酸100 mlで溶解し、方法1と同様に測定を行った。表7および図4より、関節液成分が含まれていても、含まれていないときの測定結果と同様の検量線が得られた。この結果より、関節液成分の影響を受けないことが確認された。また、ピロリン酸ナトリウムにおいても同様の結果を得た（図なし）。

#### 3. モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関

関節液のピロリン酸カルシウム量と遊離ピロリン酸量との関係を把握するためには、遊離ピロリン酸の測定が必要となる。そこで、モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットの相関を見るために、0.3 mol/lのピロリン酸ナトリウム水溶液を作成し、モリブデンブルー法用とピロリン酸測定キット用の標準液をそれぞれ作成した。この標準液をもとに希釈系列を作成し、両方法における吸光度値を算出し

表5. モリブデンブルー法を用いたピロリン酸カルシウムの測定における吸光度

$\mu\text{mol/l}$	0.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Abs.	0.026	0.164	0.342	0.513	0.640
$\Delta\text{Abs.}$	0.000	0.138	0.316	0.487	0.614

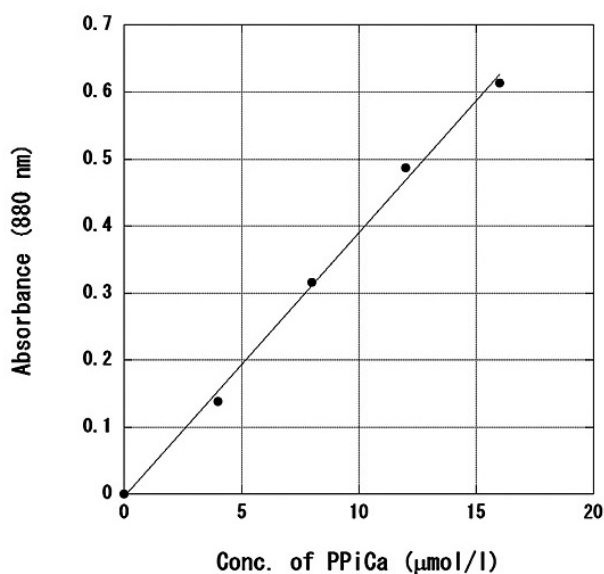


図2. ピロリン酸カルシウムと吸光度との関係線

表6. モリブデンブルー法を用いたピロリン酸カルシウムの測定における吸光度

$\mu\text{mol/l}$	0.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Abs.	0.028	0.181	0.348	0.501	0.688
$\Delta\text{Abs.}$	0.000	0.158	0.325	0.478	0.615

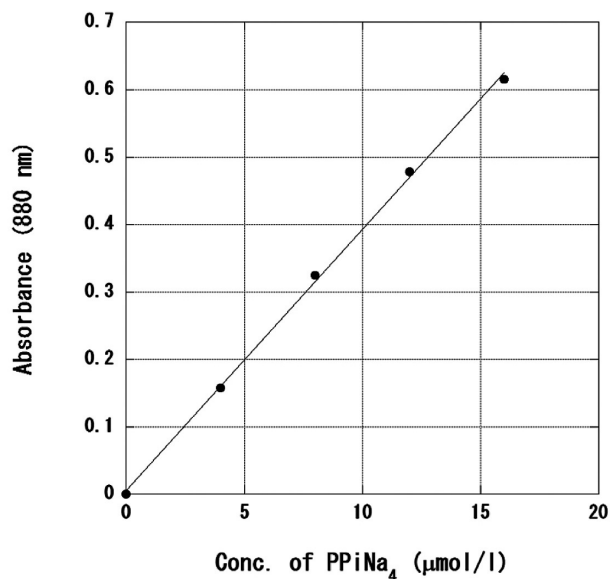


図3. ピロリン酸ナトリウム濃度と吸光度との関係線



表7. 関節液類似液添加後のピロリン酸カルシウムの測定における吸光度

$\mu\text{mol/l}$	0.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Abs.	0.022	0.184	0.350	0.519	0.645
$\Delta\text{Abs.}$	0.00	0.162	0.328	0.497	0.623

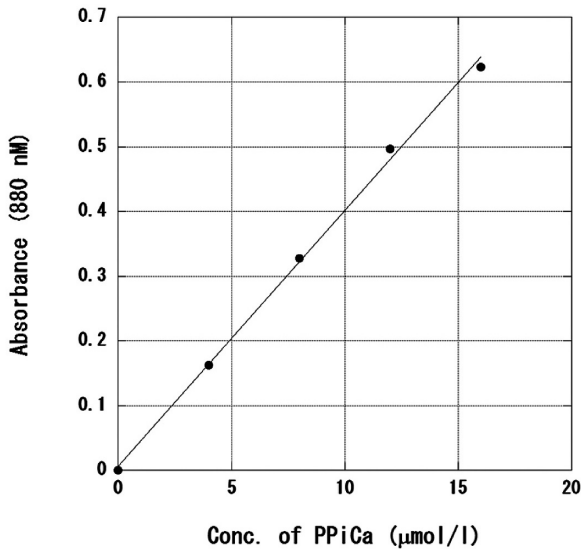


図4. 関節液成分添加後のピロリン酸カルシウム濃度と吸光度との関係線

比較した。なお、キット法との相関を見るために、モリブデンブルー法においては吸光度及び1/2の吸光度を算出した。表8ならびに図4に示すように、横軸にモリブデンブルー法を、縦軸にピロリン酸測定キットの値を取って相関を見た場合、相関係数  $r$  として0.999が得られた。

#### 4. 同時再現性と日差再現性の検討

3. のモリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関において、相関が確認できた標準液希釈系列の最低濃度 ( $4.00 \mu\text{mol/l}$  /  $400 \mu\text{mol/l}$ ) と最大濃度 ( $16.0 \mu\text{mol/l}$ ,  $1600 \mu\text{mol/l}$ ) の2濃度を用いて、同時再現性を11回、日差再現性においては11日間の測定を行った。モリブデンブルー法は、相関を見た際の検量線 (図5) より濃度を算出し、ピロリン酸測定キットは方法4を用いて計算により濃度を求めた。表9に示すように、モリブデンブルー法は同時再現性、日差再現性ともにCVが5%以下となった。ピロリン酸測定キットは同時再現性の1600  $\mu\text{M}$  以外でCVが5%以上となった。

表8. モリブデンブルー法ならびにピロリン酸測定キットのピロリン酸カルシウムの測定における吸光度

モリブデンブルー法					
$\mu\text{mol/l}$	0.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Abs.	0.004	0.164	0.335	0.503	0.677
$\Delta\text{Abs.}$	0.000	0.160	0.331	0.499	0.673
$1/2 \Delta\text{Abs.}$	0.000	0.080	0.166	0.250	0.337
ピロリン酸測定キット					
$\mu\text{mol/l}$	0.00	4.00	8.00	12.0	16.0
Abs.	0.007	0.080	0.175	0.244	0.330
$\Delta\text{Abs.}$	0.000	0.073	0.168	0.237	0.323

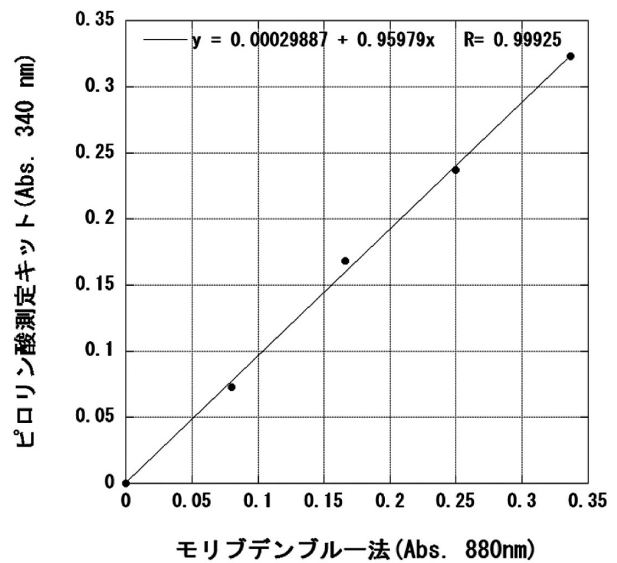


図5. モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関関係

#### IV. 考 察

今回偽痛風を引き起こす関節液中のピロリン酸カルシウムに着目し、リン酸検出感度が高いモリブデンブルー法が、ピロリン酸の定量に応用できるものと考え、実験を計画した。本研究では実際の関節液を用いる前に、難溶性である市販のピロリン酸カルシウムを用いて、ピロリン酸の定量における測定条件の基礎的検討を行った。

図2および図3に示すように、ピロリン酸カルシウムとピロリン酸ナトリウムの希釈系列における検量線を作成したところ、吸光度は0.100~1.000を示し、ピロリン酸カルシウム濃度に比例して吸光度が上昇する結果を得た。すなわち、ピロリン酸カルシ

表9. モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットにおける同時再現性と日差再現性

$\mu\text{mol/l}$		モリブデンブルー法		ピロリン酸測定キット	
		4.00	16.0	400	1600
同時	n	11	11	11	11
	Ave. ( $\mu\text{mol/l}$ )	4.11	15.9	372	1481
	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.084	0.118	32.9	55.1
	CV (%)	2.05	0.74	8.86	3.71
日差	n	11	11	11	11
	Ave. ( $\mu\text{mol/l}$ )	4.18	15.8	392	1480
	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	0.18	0.22	73.5	104
	CV (%)	4.34	1.40	18.7	7.00

ウム, ピロリン酸ナトリウム両方において同等の結果が得られることが確認できた。また, ピロリン酸測定キットの検出感度が400  $\mu\text{mol/l}$  に対して, モリブデンブルー法は, その100倍以上の検出感度(0.1 ppm 以下)をもつ<sup>3)</sup>。したがって, ごく少量のリン酸の変化量が追跡できるものと考えられる。

モリブデンブルー法で関節液を測定する際, 関節液成分が測定に影響を及ぼすかどうかを確認するために, ワダカルシウム製薬株式会社より購入した四季潤1錠を関節類似液とし測定を行った。図4より, 関節液成分が含まれていても, 含まれていないときの測定結果と同様のピロリン酸カルシウム濃度と吸光度との検量線が得られた。この結果より, 関節液成分の影響を受けないことが確認された。Lampeらは<sup>7) Briggs<sup>8)</sup></sup>が開発したりん酸比色分析法を応用し, 硫酸加熱条件下で有機リン酸含むリン酸が, すべてモノリン酸に分解されることを報告している。このことから, 今回用いたモリブデンブルー法は, たとえ共存物質があったとしても, 硫酸酸性下では, 有機物が分解されるとともにほぼすべての有機リン酸が, モノリン酸に分解できているものと考えられる。

関節液のピロリン酸カルシウム量と遊離ピロリン酸量との関係を把握するためには, 遊離ピロリン酸の測定が必要となる。そこで, モリブデンブルー法とピロリン酸測定キットとの相関を観察した。図5に示すように, 横軸にモリブデンブルー法を, 縦軸にピロリン酸測定キットの値を取って相関を見た場合, 相関係数  $r$  として0.999が得られた。すなわち, 遊離ピロリン酸をピロリン酸キットで測定し, 一方で, モリブデンブルー法ですべてのモノリン酸量を算出できれば, 関節液における遊離ピロリン酸量と

全リン酸量との比較が行えるため, 偽痛風の進行度合いに則した情報を提供できるかもしれない。

モリブデンブルー法およびピロリン酸測定キット両方法において同時再現性と, 日差再現性を観察したところ(表9), モリブデンブルー法は同時再現性, 日差再現性ともにばらつきが小さいことが確認できた。一方で, ピロリン酸測定キットは, モリブデンブルー法に比べ同時再現性, 日差再現性のばらつきが大きかった。これらの原因として, 反応温度の影響が考えられる。ピロリン酸測定キットは, 方法4に示すように試薬を入れて加温した後, 標準液や検体を加え, さらに加温する工程が必要である。測定の際に一度恒温槽から石英セルを取り出した後, 標準液や検体を加えて混和し, 再び恒温槽に戻して加温したため, 温度を一定に保つことができていなかったと考えられる。今後, 温度制御装置を付属した分光光度計を用い, 温度の管理を徹底できれば, ばらつきの問題は解決できるものと思われる。

## V. 結 語

偽痛風の診断が困難なケースに, モリブデンブルー法をもとにしたピロリン酸カルシウムの測定が応用できるのではないかと考えた。モリブデンブルー法は検量線の作成ならびに再現性を含めて良好な結果が得られた。さらに, ピロリン酸測定キットとの相関関係も良好であることがわかった。今後は偽痛風患者の関節液を用いて, モリブデンブルー法ならびにピロリン酸測定キット法が, 診断に有効であるかを検討していく予定である。

## 文 献

- 1) 益田郁子: 偽痛風 (CPPD 結晶沈着症) とその治療. 総合臨牀, 59: 281-286, 2010.
- 2) 緒方正光: Calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease の臨床的研究. 日整会誌, 59: 819-834, 1985.
- 3) 松本和子, 酒井健: 化学への招待「モリブデンブルーの発色とリン酸定量への応用」. 化学と教育, 35: 420-423, 1987.
- 4) 日本分析化学会北海道支部編, 「水の分析」第4版, 化学同人, p269, 1994.
- 5) O'brien W : A continuous spectrophotometric assay for argininosuccinate synthetase based on pyrophosphate formation. Anal Biochem 76 : 423-30, 1976.
- 6) 西村正宏: ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の相互作用に関する研究. 広大歯誌, 29, 32-39, 1997.
- 7) Lampe D, Liu C, Potter BVL: Synthesis of selective non-Ca<sup>2+</sup>-mobilizing inhibitors of D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. J. Med. Chem. 37 : 907-912, 1994.
- 8) Briggs AP : A modification of the Bell-Doysi phosphate method. J. Biol. Chem. 53 : 13-16, 1924.

(平成26年 1月31日受理)

## Fundamental study of calcium pyrophosphate measurement relevant to Pseudogout diagnosis

Kaori FUKUNAGA, Syohei UEDA, Makoto KIKUCHI,  
Tadashi OKAWARA, Kensaku ANRAKU

Pseudogout is an acute arthritis caused by deposition of calcium pyrophosphate dihydrate in the arthritis. Both methods of the polarizing microscope CPPD crystals in synovial fluid and the articular cartilage calcification by X-ray imaging are currently helpful to diagnosis for Pseudogout. In some cases, however, is difficult to diagnose in these methods for a symptom. In this study, we developed the determination of calcium pyrophosphate by using molybdenum blue method measuring in phosphate concentration following the hydrolysis of calcium pyrophosphate to monophosphate in the sulfuric acid. We also compared the values in quantitative measurement between the pyrophosphate assay kit and molybdenum blue method, resulting in a good correlation. Furthermore, the molybdenum blue method could show both reproducibility and sensitivity, it would be a potential application in diagnosis for Pseudogout.