

ウイルソン病マス・スクリーニング の基礎的検討

水嶋 好清*¹ 山口 昭弘 福士 勝 清水 良夫
菊地由生子 荒島真一郎*²

要 旨

ウイルソン病を早期に発見するためのスクリーニング法として、濾紙血液中のセルロプラスミン(CP)を高感度に測定する ELISA 法を開発した。本法は低濃度域まで再現性良く測定できた。出生後からの CP の経時変化を調べたところ、新生児期から経時的に増大し、生後 6 ヶ月頃で一定となった。

ウイルソン病の患者 15 例のセルロプラスミン値は 11 例が 2 mg/dl 以下、2 例が 3~5 mg/dl、2 例が 10~15 mg/dl であり、成人期の正常値と比較していずれも低値であった。

新生児 4~7 日における CP の分布は 8,351 例で 13.5 ± 3.8 mg/dl、患者 15 例では 3.1 ± 4.4 mg/dl であり、カットオフ値を 5.0 mg/dl とすると、患者の 80% 以上は低値となり、また偽陽性率も 0.35% と低値で、新生児期のスクリーニングが可能であると思われた。

1. 緒 言

ウイルソン病は頻度も高く、治療可能な疾患としてマス・スクリーニングが期待される疾患である。本症の血清セルロプラスミン(以下 CP)は健常者より低値を示し^{2,3,4)}、CP 測定によってスクリーニング可能かどうか検討されてきたが^{4,5,6)}、検査法、採血時期等にさまざまな問題が残されている。

そこで、スクリーニングに便利な濾紙血液を用い、高感度に再現性よく測定できる CP の ELISA 法を開発し、ウイルソン病患者 15 例の CP 値の分布と採血時期として新生児期にスクリーニング可能かどうか検討を行った。

2. 方 法

2-1 対 象

未治療ウイルソン病患者 3 例、治療中の患者 12 例、正常新生児および 1 歳までの乳児、正常成人について、濾紙血液および一部の検体については血清を材料とした。

2-2 CP の ELISA 法

濾紙血液を用いる CP の ELISA 法は、二段階サンドイッチ法を原理とし、抗ヒト CP ウサギ抗体をマイクロプレートに固相化、抗ヒト CP ヤギ抗体酵素標識体を用いて測定する。

2-2-1 固相化マイクロプレート

抗ヒト CP ウサギ抗体(Dako 社, A 031)を 1,000 倍希釈 ($OD_{280} = 0.025$) して、96 穴マイクロプレート(Nunc 社、高方価 ELISA 用)に 100 μ l 分注し、一晩 25°C で静置し、リン酸生理食塩水(以下 PBS)で洗浄後、0.1%ウシ血清アルブミン(以下 BSA)含有 PBS を 400 μ l 分注後、4°C で保存する。

2-2-2 CP 抗体酵素標識液

抗ヒト CP ヤギ抗体酵素標識体(EY LABS 社, PA 2122-1)を BSA 含有 PBS であらかじめ 10 倍希釈保存し、使用时さらに 200 倍希釈して用いる。

2-2-3 CP 標準濾紙血液

CP 標準濾紙血液は NOR パルチゲン蛋白標準血漿(ヘキストジャパン社)と O 型成人血液を生理食塩水で洗浄して得られた洗浄赤血球を等量混合し、代謝異常検査用濾紙に滴下乾燥させ使用する。

2-2-4 測定手順

濾紙血液を用いる CP の ELISA 法の測定手順は、まず 3 mm ディスク 1 枚を 200 μ l の BSA 含有 PBS で溶出させ、20 倍希釈後の 20 μ l をサンプルとする。血清の場合は 1,000 倍希釈液を 10 μ l 用いる。サンプルを固相化マイクロプレートに分取し、100 μ l の BSA 含有 PBS を分注後、25°C 一晩第一反応を行う。PBS で 4 回洗浄後、CP 抗体酵素標識溶液 100 μ l を分注し、

*¹ 現在札幌市白石保健所所属 *² 北海道大学医学部小児科

25℃ 2時間第二反応を行う。PBSで4回洗浄後、150 μ lの発色試薬(OPD1錠(2mg, カルビオ社)を16mlの0.015% H_2O_2 含有0.1molクエン酸緩衝液で溶解)を分注し、酵素反応を30分間行い、3N硫酸100 μ lで反応を停止させ、490/650nmの吸光度を測定し、標準曲線により濃度を算出する。

2-3 CPのPPD-oxidase法

本法はRabin法に従って行った。すなわち血清20 μ lを用い、0.5%パラフェニレンジアミン(PPD)溶液を100 μ l加え、さらに0.1mol酢酸緩衝液(pH 4.0)を200 μ l加えて37℃30分反応させ、0.3% NaN_3 溶液100 μ lで停止させ、さらに蒸留水600 μ lを加える。同時に反応0分の対照を設ける。血清の代わりに蒸留水で行った盲検により530nmで吸光度を測定する。既知濃度の標準血清より濃度を計算する。

2-4 CPのフェロオキシダーゼ法

データナー-CPキット(協和メデックス社製)を用いて行った。すなわち血清30 μ lを用い、前処理液1.5ml、発色液1.5mlを加え、37℃10分反応させ、反応停止液1.0mlで反応を停止させ、盲検を対照として755nmで吸光度を測定する。標準血清により濃度を算出する。

2-5 CPのSRID, レーザーフェロ法

CPのSRID法はNORパルチゲンCPおよびレーザーフェロ法はいずれもベキストジヤパン社のキットを用いて行った。

2-6 血清銅の高感度測定法

血清銅の測定はAbeらの方法に従って行った。すなわち、0.2mol酢酸緩衝液(pH 5.0)100mlにDiBr-PAESA(ドータイト)1mg溶解したものと、0.35molアスコルビン酸を14対1で混合した反応試薬を用いる。この反応試薬1.5ml用い、血清100 μ lと反応させる。緩衝液で反応させた液を対照として580nmの吸光度を測定し、銅標準液より濃度を算出する。

3. 結果

3-1 ELISA法の基準的検討

ELISA法には競合法、サンドイッチ法があるが低濃度域の感度上昇のため、サンドイッチ法とした。使用する抗体によっては非特異反応が起こることから、各種市販の抗体について反応性を検討したところ、本法の抗ヒトCPウサギ抗体をマイクロプレートに固相化

し、抗ヒトCPヤギ抗体酵素標識体を用いる方法が最も良かった。一段階サンドイッチ法では、10ng/well以上でスタンダードカーブが逆転し、レンジも0.1~10ng/wellと狭いため二段階サンドイッチ法とした。10ng/well以上でスタンダードカーブは一定となったが、逆転することは無かった(図1)。

試薬の濃度等について検討したが、方法に示す濃度が最も良好であった。

反応時間の検討では、第二反応時間を2時間と一定

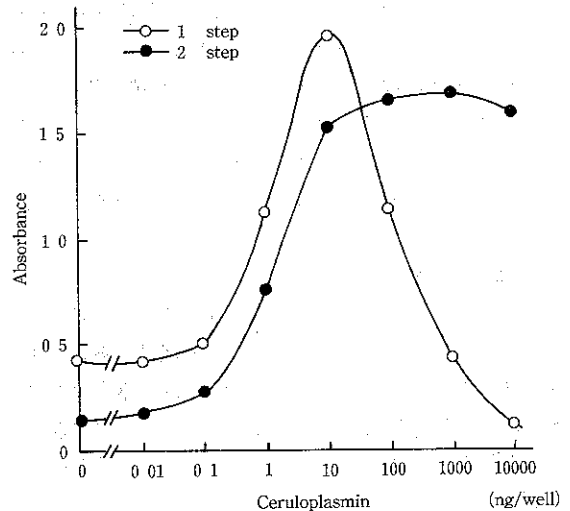


図1 セルロプラスミン ELISA の一段階、二段階サンドイッチ法による測定レンジ

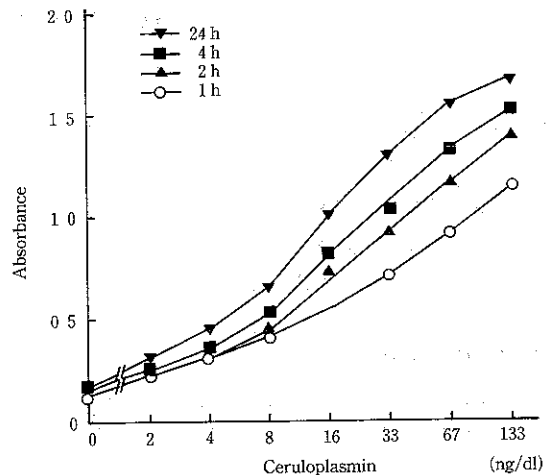


図2 セルロプラスミン ELISA の第一反応時間の变化によるスタンダードカーブ

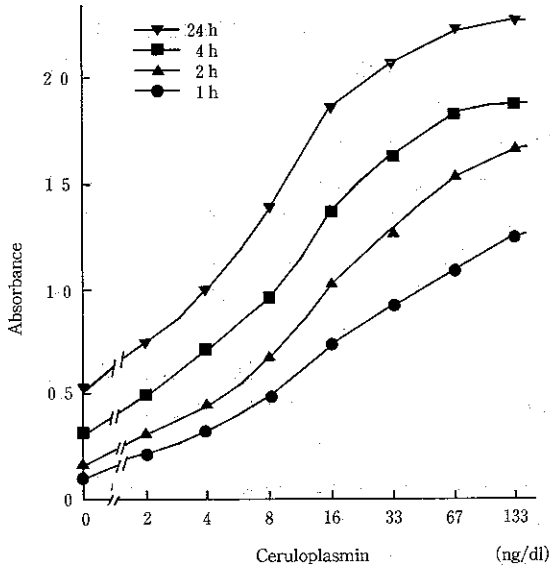


図3 セルプラスミンELISAの第二反応時間の变化によるスタンダードカーブ

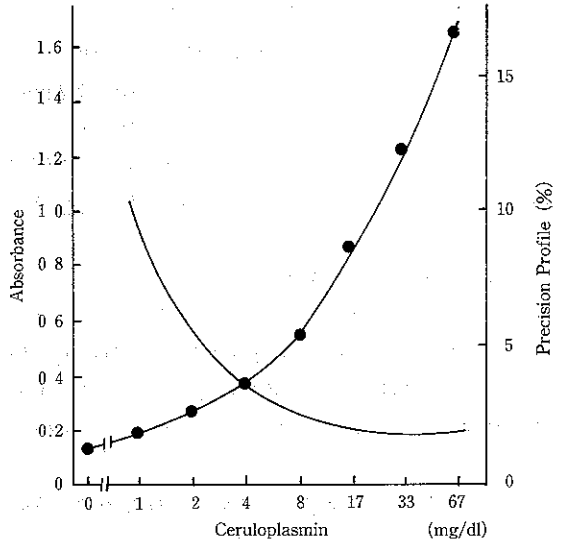


図4 濾紙血液によるセルプラスミンELISAのスタンダードカーブとPrecision Profile

にし、第一反応時間について、1、2、4、24時間と変化させたところ、短時間でも十分反応するが、より感度の高い24時間とした(図2)。また、第一反応時間を24時間とし、第二反応時間を1、2、4、24時間

と変化させたところ、時間の経過とともに0濃度の吸光度が上昇することから、測定感度が良好な2時間とした(図3)。

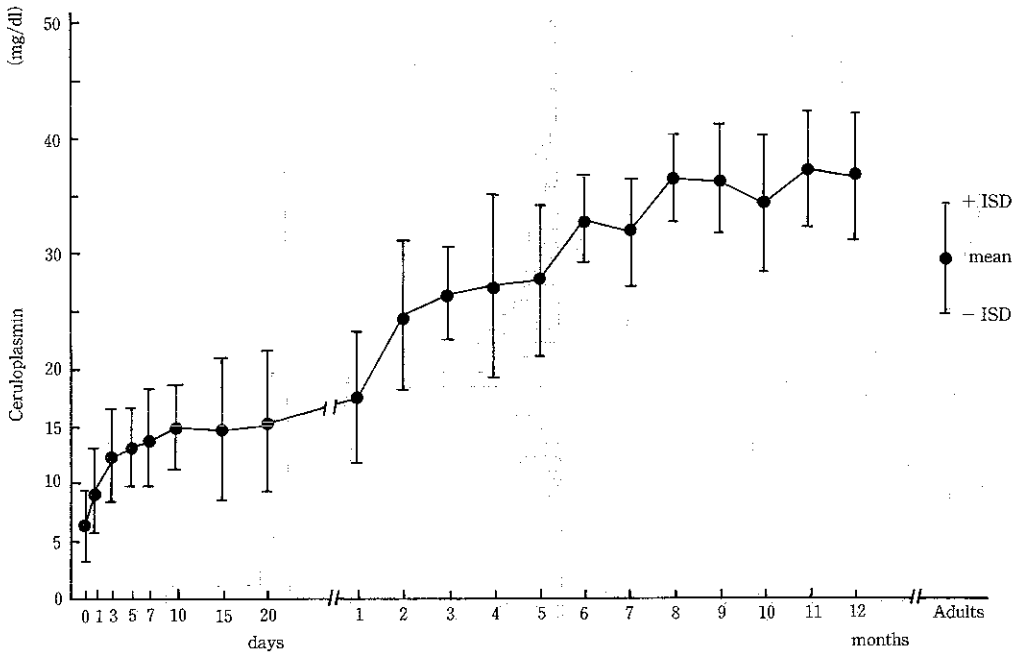


図5 採血時期によるセルプラスミン値の変化

3-2 ELISA法の標準曲線と再現性

濾紙血液を用いるELISA法における標準曲線のレンジは0.5~67 mg/dlで、Precision profileは2 mg/dl以上で2~5%と非常に安定であった(図4)。

また、2~40 mg/dlの検体について測定内、測定間変動を調べたところ2.4~8.5%と良好な再現性を示した。

3-3 日月令別CP値の変化

出生後から1歳までのCP値の経時変化を調べた(図5)。CP値は出生直後は低値であるが、経時的に増大し、生後5日目でCPの平均値は13.5 mg/dl、1カ月で17.5 mg/dlとなり、生後6カ月ではほぼ一定値となった。

3-4 新生児、1カ月児、ウイルソン患者のCP値の分布

新生児4~7日での分布は8,351例で13.5±3.8 mg/dl、1カ月で17.5±5.7 mg/dl、患者15例では3.1±4.4 mg/dlであった。15例のうち13例は5.0 mg/dl以下の値を示し、新生児の分布より低値であった(図6)。

3-5 患者のCP値の各種測定法による比較

治療前の患者3例、治療中の患者12例の濾紙血液、血清の測定値を比較した(表1)。CPのELISA法では濾紙血液、血清とも同等な測定値、相関を示した。

治療前の1例、治療中の1例で10~15 mg/dlの値を示し、2例は3~5 mg/dl、11例は2 mg/dl以下であった。SRID法では測定限界が5 mg/dlであり、低値まで注意して計測するとELISA法で低値例は1 mg/dlと概算できるが、ネフエロメトリーでは計測値が5~6 mg/dlとなり、必ずしも低値を示さなかった。PPDオキシダーゼ法ではややばらつきは認められるが、ELISA法と同等の値を示した。

血清銅については高感度測定法により血清0.1 mlで測定したが、CP値とよく相関し、未治療のNo 1では血清銅はCP値に比して高値であった。

4. 考 察

ウイルソン病は肝臓・脳・角膜等に銅が蓄積し、肝障害など多彩な症状を呈する先天性銅代謝異常症で、発症も5歳頃から40歳代と多彩である^{3,8)}。病因につ

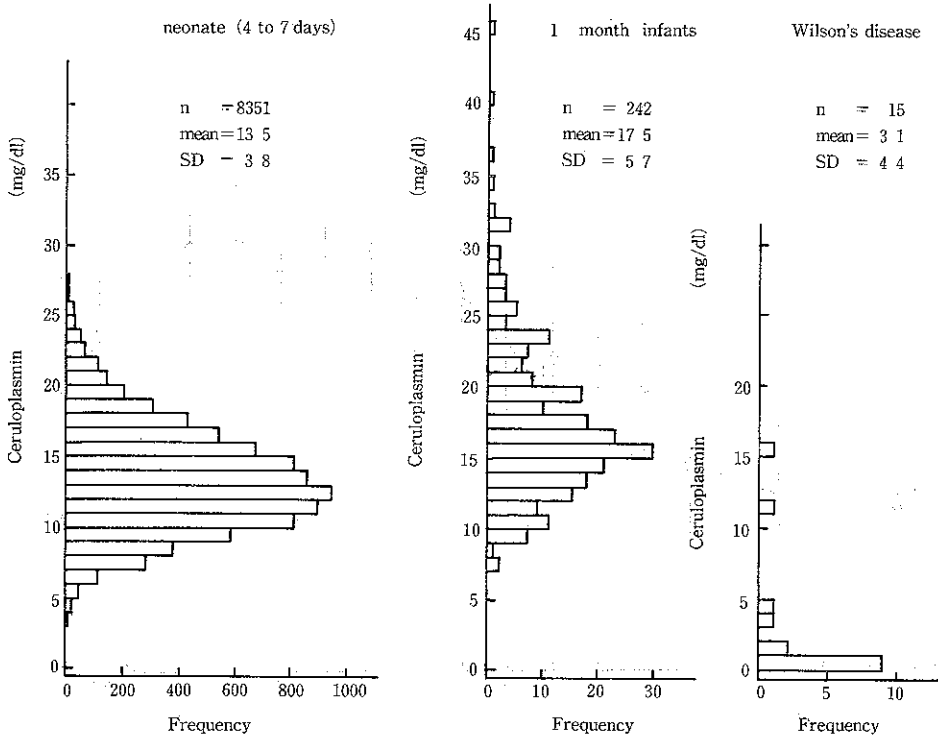


図6 新生児、1カ月および患者のセルロプラスミン値の分布

表1 ウイルソン病患者の測定結果

| NO | 性別 | 血清 CP | | | | | | 血清 銅 |
|----------------|----|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 濾紙血 CP ELISA (mg/dl) | ELISA (mg/dl) | SRID (mg/dl) | Nephelometric (mg/dl) | Ferro-Oxidase (mg/dl) | PPD-Oxidase (mg/dl) | DiBr-PAESA法 (μ g/dl) |
| 治療前患児 | | | | | | | | |
| 1 | 女 | 11.9 | 14.3 | 14 | 13 | 18.8 | 13.7 | 104 |
| 2 | 男 | 1.92 | — | — | 5 | — | — | — |
| 3 | 男 | 0.87 | — | — | — | — | — | — |
| 治療中患児 | | | | | | | | |
| 4 | 女 | 15.2 | 13.7 | 14 | 16 | 13.7 | 13.2 | 58 |
| 5 | 男 | — | 4.74 | 5 | 6 | 3.6 | 3.7 | 20 |
| 6 | 女 | 3.26 | 3.62 | 4 | 6 | 2.2 | 1.0 | 17 |
| 7 | 女 | 0.85 | 0.94 | 1 (<5) | 6 | 3.1 | 1.4 | 10 |
| 8 | 女 | 0.97 | 0.95 | 1 (<5) | 6 | 3.0 | 1.3 | 3 |
| 9 | 男 | 0.80 | 1.46 | 1 (<5) | 5 | 3.0 | 1.9 | 10 |
| 10 | 女 | 0.88 | 0.93 | 1 (<5) | 6 | 2.7 | 0 | 12 |
| 11 | 男 | 0.93 | 1.18 | 1 (<5) | 6 | 1.8 | 1.1 | 12 |
| 12 | 女 | 0.87 | 1.20 | 1 (<5) | 6 | 1.7 | 0 | 10 |
| 13 | 女 | 0.54 | 0.70 | 1 (<5) | 6 | 5.0 | 0.5 | 10 |
| 14 | 女 | 1.91 | 1.71 | 1 (<5) | 6 | 2.3 | 0 | 16 |
| 15 | 女 | 0.70 | — | — | 6 | — | — | — |
| 患児家族 | | | | | | | | |
| 1 妹 | | 18.7 | 18.8 | 20 | 20 | 21.5 | 17.7 | 72 |
| 1 父 | | 13.9 | 15.4 | 15 | 17 | 18.4 | 16.5 | 66 |
| 1 母 | | 12.7 | 12.9 | 13 | 14 | 13.9 | 13.7 | 48 |
| 成人対照 (N=46) | | 29.0 \pm 6.2 (17.9-46.3) | 28.8 \pm 4.8 (17.9-43.6) | 25.7 \pm 6.3 (17-44) | | 33.7 \pm 6.8 (20.7-56.0) | 32.9 \pm 6.6 (18.1-50.7) | 102 \pm 19 (66-172) |

SRID : ヘキスト社キット
 Nephelometric : ヘキスト社キット
 Ferro-Oxidase : 協メテック社キット
 DiBr-PAESA法 : Abe et al Clin. Chem (1989)

いては不明な点が多いが、多くの症例で低セルロプラズミン血症を伴う^{2,3,4)}。頻度は出生約30,000~35,000人に1名といわれ¹⁾、治療法が確立されている数少ない疾患である。

発症前に発見し治療管理を行う意義の高い疾患ではあるが、発症は小児期以降と遅く、新生児期には血中CP値が低いなど、発症時期や出生後のCP値の変化等から、新生児期での検査は難しいとされ^{4,9)}、3カ月以降の時期が適当と考えられている。また、検査法としては、小児期に血中CP値の低下や^{4,5,6)}、尿中銅の増量を調べる方法¹⁰⁾などで、スクリーニングが検討されている。

現在、フェニールケトン尿症やクレチン症などは生後5日目に採血され、新生児マス・スクリーニングが行われている。ウイルソン病がこの時期の血液濾紙で検査可能かどうか検討する目的で、より高感度な

ELISA法を開発し、新生児濾紙血液や患者の検体について検討した。

患者15例のCP値の分布では、このうちの2例は10~15 mg/dlと中間型の値を示し、新生児期の正常範囲内にあるが、11例は2 mg/dl以下、2例は3~5 mg/

表2 ウイルソン病の新生児期スクリーニングの可能性

n=8351

| カットオフ値 | 再採血率 | 検出率 |
|--------------------------|-------|----------------|
| mean-2SD (5.9mg/dl) | 0.69% | 87% (13/15) |
| mean-2.2SD (5.0mg/dl) | 0.35% | 87% (13/15) |
| mean-2.5SD (4.0mg/dl) | 0.06% | 80% (12/15) |

dlと低値を示した。この値を新生児期の分布にあてはめ、カットオフ値を5 mg/dl (mean-2.2 SD) とすると、再検率は0.35%、検出率は87%となり、またカットオフ値を4 mg/dl (mean-2.5 SD) とすると、再検率は0.06%、検出率は80%となった(表2)。

ウイルソン病でCPが5 mg/dl以下の割合は青木ら¹¹⁾、Gibbsら²⁾、Schenbergら³⁾では52~64%とされるが、我々の開発したELIAS法では低値の割合が87%と高率で、偽陽性率も0.35%と低値であった。

CPを低濃度域まで高感度で測定できるELISA法では、ウイルソン病のうちCP低値を示す約80%は新生児期でもスクリーニングが可能と考えられる。

また、採血時期として、6カ月児あるいは3歳児等の乳児、小児期に血液が採血され、小児期のマス・スクリーニングが可能となれば、その時期に検査することで、発症前にはほぼ全例のウイルソン患児が発見できる可能性があると考ええる。

5. 結 語

ウイルソン病マス・スクリーニングのための高感度で再現性良好なCPのELISA法を開発した。

本法により患者15例のCP値を測定したところ、このうちの2例は10~15 mg/dl中間型の値を示し、11例は2 mg/dl以下、2例は3~5 mg/dlと低値を示した。一方、新生児4~7日での分布は8,351例で13.5±3.8 mg/dlであった。新生児のスクリーニングでカットオフ値を5 mg/dl (mean-2.2 SD) とすると、再検率は0.35%、検出率は87%となった。

CPを低濃度域まで高感度に測定できるELISA法では、ウイルソン病のうちCP低値を示す約80%は新生児期でもスクリーニングが可能と思われた。

6. 文 献

- 1) Saito T: J. Medical Genetics. **20**, 271-275, 1983.
- 2) Gibbs K and Walsche JM: Quart J Med., **48**, 447-463, 1979.
- 3) Scheinberg IH and Sternlieb I: Wilson's disease, Philadelphia, WB Saunders, 1984.
- 4) 青木継稔, 原まどか: 平成元年度厚生省心身障害研究「代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング, 進行阻止及び長期管理に関する研究」, 平成元年度研究報告書, 172-174, 1990.
- 5) 青木継稔, 中橋雅子: 医学のあゆみ, **104**, 822-824, 1978.
- 6) 北川照男, 大和田操, 鈴木健: 平成元年度厚生省心身障害研究「代謝疾患・内分泌疾患等のマス・スクリーニング, 進行阻止及び長期管理に関する研究」, 平成元年度研究報告書, 178-180, 1990.
- 7) Abe A, Yamashita S and Noma A: Clin. Chem., **35**, 552-554, 1989.
- 8) Danks DM, Scribber CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th ed, McGraw-Hill, New York, 1411-1431, 1989.
- 9) Epstein O and Sherlock S: Lancet **1**, 303-305, 1981.
- 10) 荒島真一郎: 厚生省心身障害研究「マス・スクリーニングに関する研究」, 昭和58年度研究報告書, 27-29, 1984.
- 11) 青木継稔, 水谷正興: 小児科, **30**, 369-378, 1989.

A Study of Mass-Screening for Wilson's Disease

Yoshikiyo Mizushima*¹, Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu,
Yuko Kikuchi and Shinichiro Arashima*²

ABSTRACT

We investigated the screening procedure for Wilson's disease with dried blood which was collected on filter paper. We examined the ceruloplasmin analysis of dried blood specimens using ELISA method. This method showed good reproducibility and high sensitivity. We researched the change in ceruloplasmin concentration of dried blood spots with age, there were only a small change in ceruloplasmin value after 6 th month.

Eleven patients showed results of ceruloplasmin which were below 2 mg/dl, those of two patients were 2~5 mg/dl and another two cases were 10~15 mg/dl. All cases were abnormal results in adult period.

8,351 neonates in 4~7 days after birth were screened. Mean \pm SD of ceruloplasmin value with neonate infants were 13.5 \pm 3.88 mg/dl, and those of fifteen patients were 3.1 \pm 4.4 mg/dl. If cut-off value have been set up 5 mg/dl, 80 percentile of ceruloplasmin values with patients were lower than cut-off value, and false positive ratio were 0.35%.

We thought ceruloplasmin ELISA method should be used in Wilson's disease screening test for neonates and infants.

*¹ Sapporo Shiroishi Health Center.

*² Department of Pediatrics, Hokkaido University, School of Medicine.