

札幌市におけるWilson病の新生児マス・スクリーニング

山口 昭弘 中澤恵実理 石橋麻里子 荒井 修 福士 勝
佐藤 泰昌 菊地由生子 荒島真一郎^{*1}

要 旨

札幌市では本年4月より, Wilson病の新生児マス・スクリーニングを, 全国に先駆け行政レベルで実施している。1994年4月からのパイロットスタディの結果を含め, その現況を報告すると共に, 濾紙血セルロプラズミン(CP)の新しい酵素免疫測定法(ELISA)およびLatex凝集法についても, 評価する機会を得たので合わせて報告する。

1. 緒 言

Wilson病は肝臓, 脳など組織への銅蓄積を特徴とする, 常染色体劣性遺伝の先天性代謝異常症である。臨床的には, 肝型, 肝神経型および神経型に分類され, 発症年齢も3歳から成人までと, かなり多型に富んだ疾患として知られている。最近では, Wilson病の原因遺伝子として, 細胞膜に存在する銅輸送ATPase(ATP7B)が同定されたことを受け, 組織における銅の蓄積機構あるいは人体における重金属代謝経路の解明に向けて, 注目を集めている疾患でもある¹⁻³⁾。

一方, Wilson病の治療に関しては, 組織に蓄積した銅をキレート剤により除去することで, ある程度の効果を期待できるが, 通常は確定診断・治療までに長期間を要する場合が多く, 非可逆的な組織障害を残した後に治療が開始されることになる。従って, 銅蓄積が進行していない発症前に発見し, 治療を開始することで, より効果的な治療あるいは発症予防が期待できる。また, 発生頻度については, 疫学調査の結果から⁴⁾, 我が国では1/2 3万人と中国と並んで高頻度に患者が存在することがわかっている。

これらのことから, 新生児マス・スクリーニング対象疾患の有力候補として, 尿中銅測定⁵⁾あるいは血中の銅輸送タンパク; セルロプラズミン(CP)を測定し⁶⁾, 患者を発見する試みがかなり以前からなされてきた。しかし, 尿中銅レベルはもともと低く, 患児でも極端な上昇を示さない場合があること, また, CPは新生児期には成人の1/2 1/3と低く感度的に十分な測定法がなかった上に, Wilson病の約5%はCP低値を示さないタイプであることなどから, 本格的なスクリーニングを開始するには至らなかった。このような状況の中で, 最近, 酵素免疫測定法(ELISA)を用いて濾紙血CPを測定する試みが相次いでなされ⁷⁻⁹⁾, 我々も, 高感度濾紙血CPの測定法を独自に開発し, CP低値を示さない一部の患者は発見できないものの, Wilson病の新生児マス・スクリーニングは十分可能であることを報告した¹⁰⁾。

その後, 札幌市では1995年4月から, Wilson病の新生児マス・スクリーニングを行政レベルで実施できる運びとなり, 今回, 1994年4月からのパイロットスタディの結果を含め, その現況を報告する。また, 濾紙血ホロセルロプラズミン(HoloCP)のモノクローナル抗体およびCPのポリクローナル抗体を用い

^{*1} 北海道大学医学部小児科・北海道教育大学小児保健

る2種類のELISA法試薬，さらに新しい測定法として生化学自動分析装置を用いるLatex凝集法についても，評価する機会を得たので合わせて報告する。

2. 方 法

新生児およびWilson病患者家系から得られた乾燥濾紙血液中のCPを以下の3方法により測定した。HoloCP/ELISA: HoloCP測定用ELISA試薬 (出光興産，ニッショー)，CP/ELISA: CP測定用ELISA試薬 (札幌IDL)およびCP/Latex: CP測定用Latex試薬(札幌IDL)について，それぞれの使用説明書に従った (Fig.1)。HoloCP/ELISAはモノクローナル抗体を用いる2ステップサンドウィッチ法，CP/ELISAはポリクローナル抗体 (抗ヒトCPウサギ抗体；Dako, A031)を用いる1ステップ競合法であり，CP/LatexはCP/ELISAと同じポリクローナル抗体を用いて自動分析装置用に開発された試薬である。機器としては，ELISA用には自動分注装置；MegaFlex (Tecan)およびプレートリーダー；Emax (Molecular Devices)を用い，Latex法には，生化学自動分析装置550Expression (Ciba Corning)を用いた。

また，CP標準濾紙血は，羊保存血(コスモバイオ)の洗浄赤血球とNORパルチゲン蛋白標準血漿 (ヘキスト)のPBS-1%BSAによる希釈系列を1+1に混合した後，濾紙にスポットして調製したものを各試薬共通に用いた。

3. 結 果

3-1 スクリーニング結果

1994年4月から本年7月まで(3月まではパイロット)のスクリーニング数24,118例の内，初回測定で仮のカットオフ値(HoloCP or CP:4.6mg/dl-blood)を下回ったのは271例(1.12%)であり，同一検体による再測定の結果も4mg/dl未満の低値を示した15名(0.06%)に再採血を依頼した。この内12名の再採血検査を行えたが，結果はいずれも正常であった。要再採血となった検体の半数以上にあたる9例は2,500g未満，あるいは在胎36週以下の未熟児であった。なお，再採血を行えなかった3名は，いずれも里帰り分娩のため連絡が取れなかったパイロットスクリーニング期間内のケースである。

3-2 HoloCP/ELISA とCP/ELISAの比較

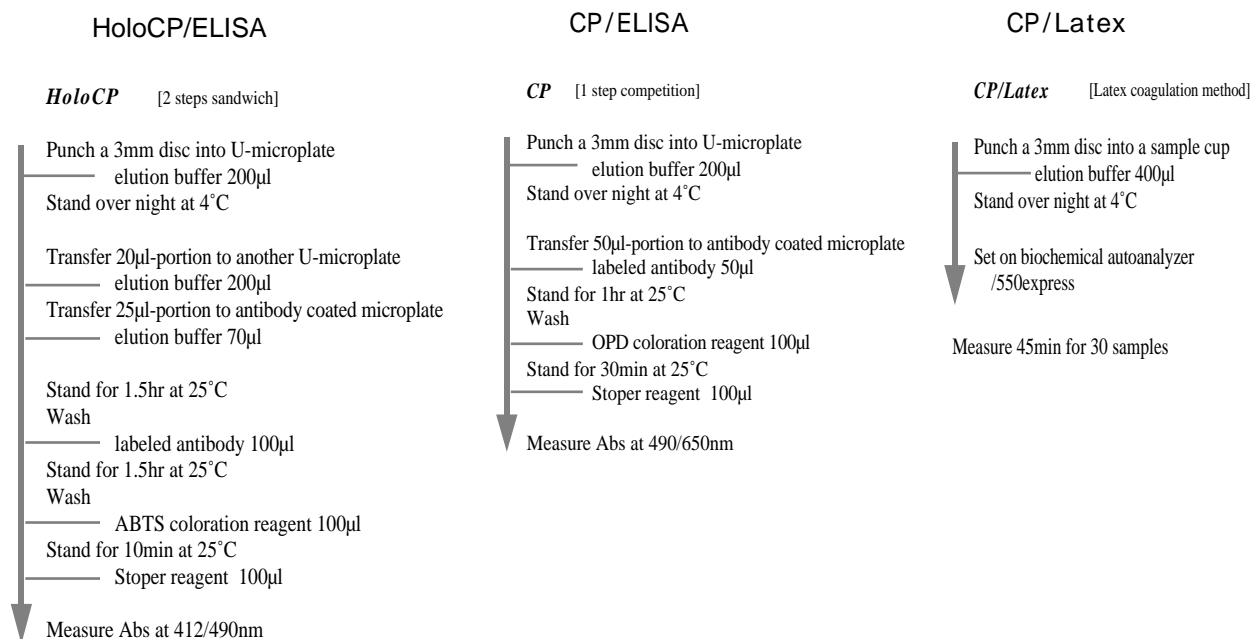


Fig. 1. Procedures for the measurements of CP in dried blood spots

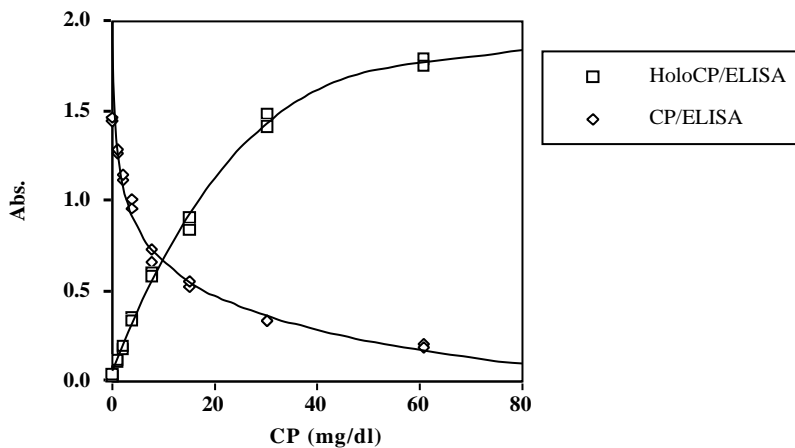


Fig. 2. Calibration curves of HoloCP/ELISA and CP/ELISA

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Count	Minimum	Maximum	# Missing
Holo-CP	10.620	3.196	.266	144	3.790	20.670	0
CP	12.881	3.112	.259	144	5.490	19.970	0

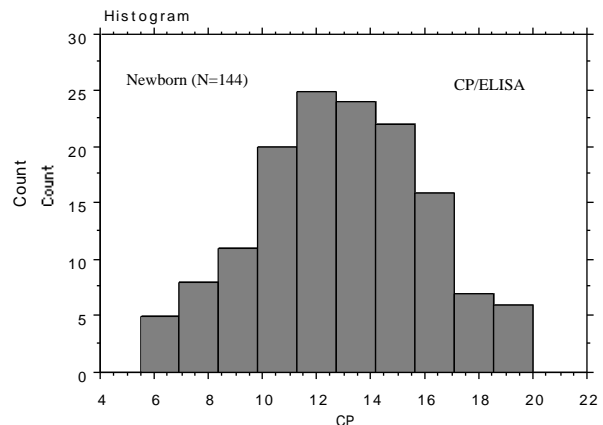
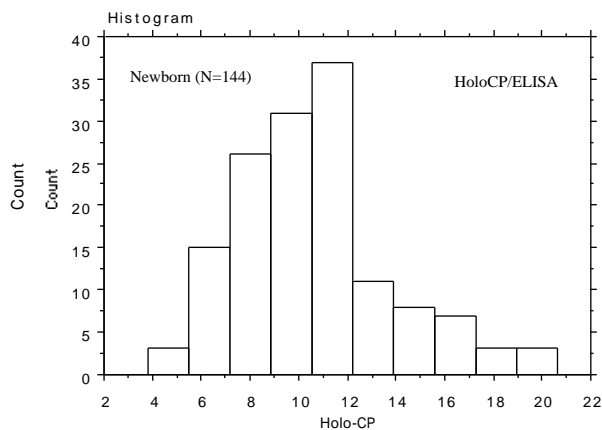


Fig. 3. Histograms of HoloCP/ELISA and CP/ELISA in newborn babies

検量線は、両方法ともCP : 2-30mg/dl-blood程度が、実際的な定量範囲であり、新生児検体の測定に対して十分な定量性を示した(Fig.2)。一般新生児検体測定値のヒストグラムは、CP/ELISAが正規分布に近いのに対してHoloCPは低濃度側に分布のシフトが認められた(Fig.3)。Wilson病患者(10名)、その家族、正常新生児および正常成人の検体についての相関および平均値を比較した(Fig.4)。CPはHoloCPに比べ2-3割高値となるが、相関関係は良好であり、患者10名の内、CP低値を示さない1名については、

HoloCPもやはり低値を示さず、正常群からの区別はできなかった。

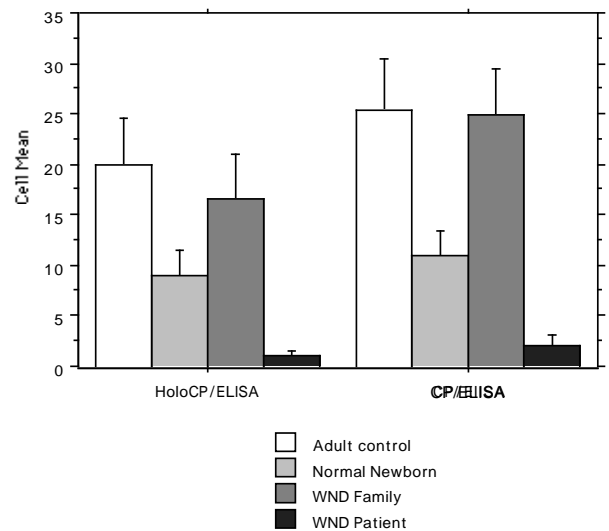
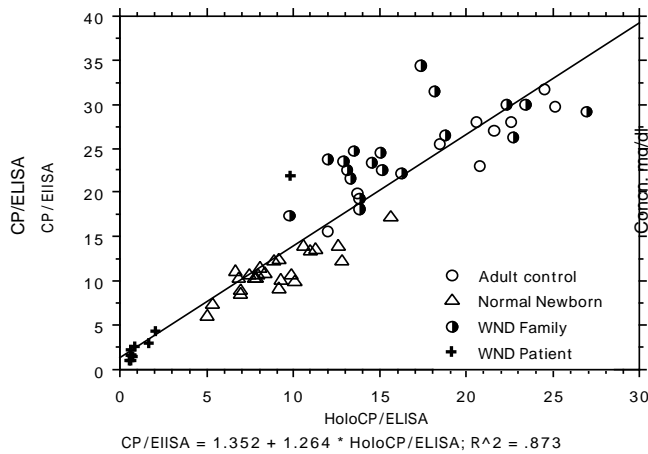
3-3 CP/ELISAとCP/Latexの比較

CP/Latexの検量線は、CP 60mg/dlまで良好な直線性を示し(Fig.5)、CP/ELISAとの相関も良好であった(Fig.6)。CP/Latex法は自動分析装置によるレートアッセイのため、簡便に信頼性の高い測定が可能であるが、30件/1時間の検体処理能力は、試料ラックの交換作業等も必要なことから、一

度に数百検体の処理が要求されるマス・スクリーニング法としては現状では不向きであった。

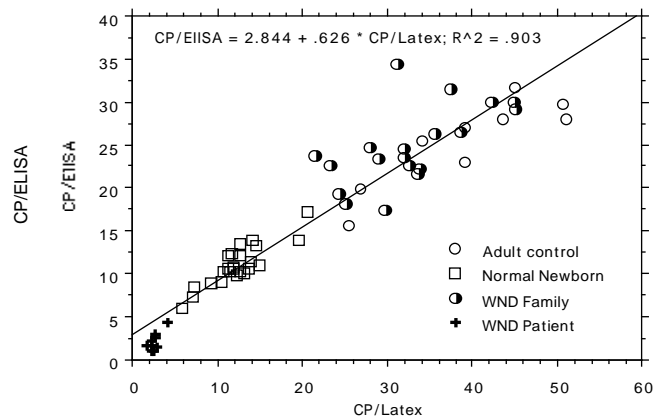
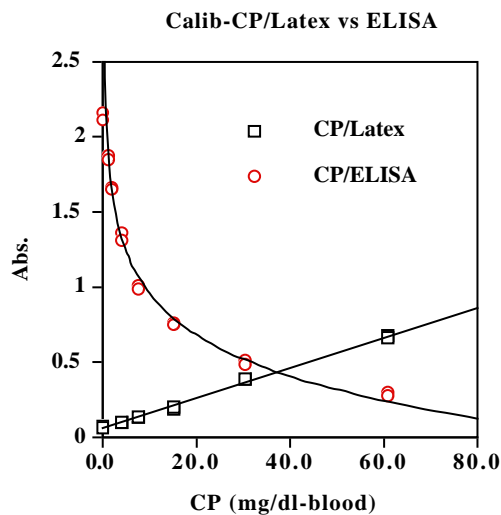
4. 考 察

方法論の比較においては、HoloCP/ELISAは試料液の高い希釈率を要する上、2ステップサンドウィッチ法のため操作が複雑であり、マス・スクリーニング法としては、かなり負荷のかかった方法である。一方、1ステップ競合法のCP/ELISAは、高い希釈率を要せず、簡便・迅速な測定が可能で、マ



(a patient who showed normal Cp is removed)

Fig. 4. Comparison of HoloCP and CP in patients with Wilson disease



(a patient who showed normal Cp is removed)

Fig. 5. Calibration curves of CP/Latex

Fig. 6. Correlation of CP/ELISA and CP/Latex

ス・スクリーニング法としてより優れた方法と言える(Fig.1)。また、Latex法は、今回用いた自動分析装置の限界のため、検体処理能力は高くはないが、ELISAのように洗浄操作あるいは標識酵素反応を要せず、凝集反応のみでより直接的に抗原抗体反応を反映することから、精度の高い測定が可能であり、2次検査法として非常に信頼できる方法である(Fig.1,5)。

一方、Wilson病患者の測定結果については、CP低値を示さない患者はHoloCPも低値を示さず、

Wilson病の原因が細胞膜における銅イオンの輸送を制御するCu輸送ATPaseの異常であり、アポCPへの銅イオンの取り込み段階の障害ではないとする、最近の報告と一致した結果となっている¹¹⁾。また、Wilson病のモデル動物であることが遺伝子レベルでも証明されたLECラットで、銅イオンの肝への蓄積が起こる以前に、CPは低値を示すこともわかっており、新生児期のCPを測定することにより、生理的にCP低値を示さない患者を除き、大多数の患者は確実に検出できるものと期待される。実際に、肝機能障

害を契機に診断された3歳のWilson病患者児について、冷蔵保存されていた新生児濾紙血の測定により、CPは低値であったことが確認されている¹²⁾。今回の患者試料は全て学童期以降の患者からのものであり、これら患者の新生児期CPレベルは不明であるが、正常人の場合CPは生後6ヶ月まで漸増し成人レベルに達することから¹⁰⁾、少なくともここでの測定値よりは低いことが予想される。従って、現在のカットオフ値CP:4mg/dlの設定により、CP低値を示さない1例を除き、9例(90%)は新生児期のスクリーニングで検出可能であったと思われる。また、再採血率0.06%については、他の新生児スクリーニング項目と比べても(フェニルケトン尿症:0.03%~クレンチン症:0.75%)、むしろ低い方の値になっている。しかも、その半数以上が未熟児であることとWilson病が他のスクリーニング対象疾患に比べれば緊急性は低く、一ヶ月健診の時点での再採血とすることにより、新生児・保護者への負担をさらに軽減することが可能である。

Wilson病遺伝子; ATP7Bのクローニングを受け、将来的に、病因遺伝子変異と臨床型の関係が解明された時、スクリーニング陽性例に対して、DNA診断が効果的な鑑別診断法となるであろう。

5. 結 語

CP/ELISAはHoloCP/ELISAに比べ、操作性に優れ、Wilson病患者の検出についても同様の性能を有することから、Wilson病マス・スクリーニングの一次スクリーニング法として有用な方法である。一方、CP/Latexは少数検体の精密測定に適した方法で

あることから、二次スクリーニング法として優れた方法である。

謝辞: 試薬のご提供を頂きました, 出光興産, ニッショーおよび札幌IDLに深謝致します。

6. 文 献

- 1) Bull P.C. et al.: Nature genet., 5, 327-337, 1993
- 2) Petrukhin K. et al.: ibid., 5, 338-343, 1993
- 3) Tanzi R.E. et al.: ibid., 5, 344-350, 1993
- 4) Reilly M and Hutchinson M: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 56, 298-300, 1993
- 5) 荒島真一郎, 他: 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, 27-28, 1984
- 6) 青木継稔, 中橋雅子: 医学のあゆみ, 104, 822-824, 1978
- 7) 千葉由美子, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌, 2, 158-159, 1992
- 8) 冷牟田修一, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌, 3, 87-88, 1993
- 9) 中村公俊, 他: 日本マス・スクリーニング学会誌, 3, 89-90, 1993
- 10) 水嶋好清, 他: 札幌市衛生研究所年報, 19, 79-85, 1992
- 11) 遠藤文男: 小児内科, 26, 132-137, 1994
- 12) 荒島真一郎, 他: 厚生省心身障害研究「マス・スクリーニングシステムの評価方法に関する研究」平成5年度研究報告書, 143-146, 1994

Newborn Screening for Wilson Disease in Sapporo City

Akihiro Yamaguchi, Emiri Nakazawa, Mariko Ishibashi, Osamu Arai, Masaru Fukushi,
Yasumasa Sato, Yuko Kikuchi and Shinichiro Arashima*¹

Newborn screening for Wilson disease has just started at April '95 in Sapporo city by measuring ceruloplasmin (CP) in dried-blood spots on filter paper cards with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). We describe the results including the preliminary pilot study from April '94 to March '95. Newborn babies of 24,118 were screened with cut-off value of CP 4mg/dl-blood, then 15 cases (0.06%) were requested second cards because of successive lower CP values even with a repeat test on the same cards. The second cards from 12 of 15 cases were obtained, however, all of them were turned to be normal showing higher CP values than the cut-off. We also discuss here the methodological comparison of ELISA methods adopting different antibodies of origin; one is using monoclonal antibody for holoceruloplasmin; HoloCP/ELISA and the other is polyclonal antibody; CP/ELISA. In addition, Latex coagulation technique designed for a biochemical autoanalyzer using the same polyclonal antibody; CP/ Latex is also evaluated. CP/ELISA finally was the best method as a primary test since its simpler and easier procedure in comparison to that of HoloCP. CP/Latex method which is expected to obtain more reliable results with full automation is rather suitable as a secondary or follow-up test before request second card since the limitation of sample number processed at once.

*¹Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine; Department of Child Health, Hokkaido Educational College