

ネフェロメトリーによるウィルソン病マス・スクリーニング

野町祥介 三浦友未佳 田上泰子 福士 勝 佐藤勇次 藤田晃三

要 旨

札幌市では新生児乾燥濾紙血液からセルロプラスミンを溶出し酵素免疫法を用いて測定することにより、ウィルソン病のマス・スクリーニングを行ってきた¹⁾。今回、ネフェロメトリー法による測定を検討した結果、精度、迅速性に優れており、本法により1999年の7月から9月の間に市内で出生した新生児2,746人のスクリーニングを実施した。この間、ウィルソン病患者は発見できなかったが、本法は低濃度のセルロプラスミンの測定に有効であり、マス・スクリーニングに十分応用できるものと考えられた。

1. 緒 言

ウィルソン病は常染色体劣性遺伝の先天性銅代謝異常症であり、特有な神経症状、肝障害、腎障害、角膜の Kayser-Flescher ring は、脳、肝、腎、角膜への銅の過剰蓄積に起因するとされている。その責任遺伝子である ATP7B がクローニングされ、蛋白産物である銅輸送 ATPase は細胞膜上に存在する銅のイオンチャンネルと考えられ、細胞内外の銅輸送の制御および過剰銅を肝から胆管へと排泄する機構を担っている²⁾³⁾。本症の発症時期は小児期から思春期前期が多いが、臨床的に多臓器障害が出現する前に診断することにより、効果的な治療が期待できる疾患である。そこで新生児スクリーニングの対象疾患として検討が行われてきた。

札幌市では1995年4月から、酵素免疫法による乾燥濾紙血液を用いたセルロプラスミン (ceruloplasmin, 以下 CP) の測定によりウィルソン病の早期発見のため新生児スクリーニングを実施している。

今回、その測定法として、本来血清をサンプルとして行なわれるネフェロメトリーを原理とする全自動免疫化学分析装置を用いてその検討を行った。その結果、良好な成績を得たので、基礎的検討成績

と新生児マス・スクリーニングに応用した成績を報告する。

2. 方 法

2-1 対象

スクリーニング対象とした新生児は、1999年7月から9月まで札幌市内で出生した2,746人である。

2-2 方法

2-2-1 測定原理

一定量の血清サンプルに抗 CP 血清を添加して、添加直後と一定時間経過後の抗原抗体反応複合体生成量の変化を、波長 840nm の光を照射してその散乱光の強度の変化により検出する。

2-2-2 測定手順

乾燥濾紙血液への応用のため、直径 5mm のディスクを打抜いた乾燥濾紙血液に、ネフェロメトリー用緩衝液 (N-反応緩衝液: デイド・ベーリング社製) 400 μ l を加えて 4 で 16 時間から 18 時間静置して CP を溶出させ、2,000 回転で 10 分間遠心した上清をサンプルとした。また、血清では 20 倍希釈サンプル 100 μ l、抗血清 40 μ l、インキュベート時間 6 分の条件で測定するところを、本法では最終的に乾燥濾紙血液溶液 50 μ l、抗血清 15 μ l、インキュベート

時間 30 分とした。サンプル, 抗血清の分注, 測定, データ解析は全自動免疫化学分析装置ベーリングネフェロメータ (BN) (デイド・ベーリング社製) により行った。

3. 結果

3-1 測定法の基礎的検討

3-1-1 サンプル量の検討

多数検体を低コストで行う目的で抗血清量を 15 μ l としたため, 使用するサンプル量を 50 μ l と 90 μ l の両者で検討した。90 μ l 系では一部の検体で反応開始 20 分過ぎから反応曲線が急激に上昇して直線性を示さず, 異常高値を示す例が見られた(図 1)。50 μ l 系の反応曲線はすべて直線性を示した。この方法による最低検出感度は約 1mg/dl で, 私たちの従来行ってきた酵素免疫法とほぼ同じであった。

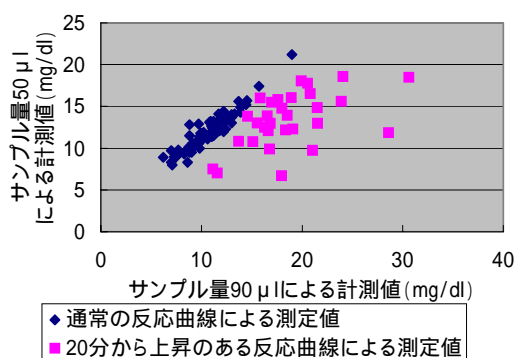


図1 2種の系による計測値の比較分散図

3-1-2 再現性

新生児期におけるウィルソン病スクリーニングでカットオフ値と考えられる 2 濃度の内部精度管理検体で検討した, 同一アッセイ内の変動係数は 2.8-7.4%, 連続 10 回のアッセイ間変動係数は 5.9-12.5%と良好であった。

3-1 スクリーニングの成績

新生児 2,746 人の C P 値の分布を図 2 に示した。その分布はほぼ正規分布をとり, 平均値 \pm 標準偏差は 10.49 ± 3.21 mg/dl であった。再採血が必要であったのは 11 例 (0.40%) で, 再検査では全例で C P 値

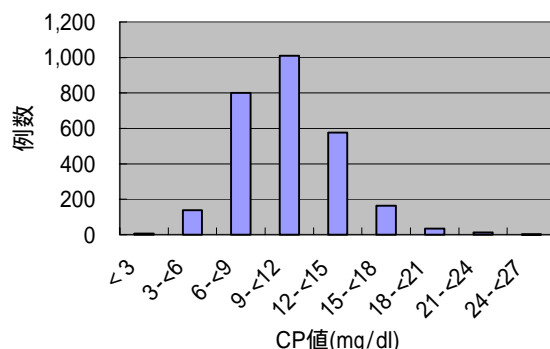


図2 新生児のCP値分布

表1 出生体重別初回検査時の血清中 CP 濃度

出生体重	例数	C P 濃度(mg/dl) 平均 \pm 標準偏差	6mg/dl 以下 例数 (%)
1500g 以下	28	6.21 ± 2.74	16 (57.1%)
1500 ~ 2000g	40	6.88 ± 2.58	14 (35.0%)
2000 ~ 2500g	173	9.35 ± 2.87	16 (9.24%)
2500 ~ 3000g	1044	10.21 ± 3.06	55 (5.27%)
3000 ~ 3500g	1122	10.81 ± 3.23	42 (3.74%)
3500g 以上	343	11.67 ± 3.02	3 (0.87%)
合計	2746	10.49 ± 3.21	146 (5.31%)

は上昇し正常と判定された。特に低出生体重児では本法でも低値を示す傾向が高く, 出生体重 2,000g 以下の児では 68 人中 30 人(44.1%)が 6mg/dl 以下と高頻度に低値を示した(表 1)。しかし, 4mg/dl 以下の異常低値を示した例でも生後 1 ヶ月後の体重の増加とともに C P 値も正常値に上昇した(図 3)。

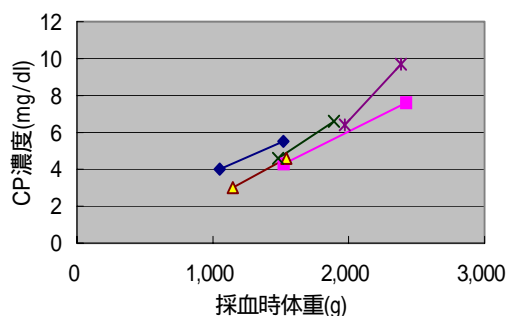


図3 体重増加に伴うCP濃度の変動

4. 考 察

乾燥濾紙血液は、採血と検体の輸送が容易で、血中のアミノ酸、ホルモン、酵素、抗体、薬剤等の保存安定性に優れていることから、その高感度測定法の開発により新生児を対象とした先天性代謝異常症検査等のマス・スクリーニングに広く用いられている。札幌市ではこの新生児乾燥濾紙血法を用いることを前提に、ウィルソン病を 1995 年から新たにマス・スクリーニング項目として取り入れ、その方法を検討し、ルーチンのスクリーニングに応用してきた¹⁾。今回採用した全自動免疫化学分析装置 BN による血清蛋白測定方法⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾は、簡便性からもマス・スクリーニングのアクセシビリティとして推奨できる。

実際に正常新生児検体の測定値は、正規分布を示し、その値は酵素免疫測定法による結果とほぼ一致し、酵素免疫法と同等の感度が得られた。さらに、臨床データと遺伝子解析からウィルソン病と診断された 2 例の小児と成人の本法による C P 値は、それぞれ、2.0mg/dl, 1.3mg/dl と低値を示した。

ウィルソン病のマス・スクリーニングの問題点としては、低体重の新生児において、ウィルソン病患者ではなくても C P 値が低くなる傾向があるため、比較的多くの検体について、再採血と再測定が必要になった。現在までのところ、再採血例は体重の増加とともに C P 濃度が上昇し、最終的には正常の値を示すようになった。

これらのことから、新生児乾燥濾紙血法を用いたネフェロメトリーによるウィルソン病のマス・スクリーニングは可能であると考えられる。また、ウィルソン病患者の 5% は C P 値が正常を示すことから、新生児スクリーニングによっても全例発見することができないことを理解しておく必要がある。

5. 結 語

全自動免疫化学分析装置 BN による乾燥濾紙血をサンプルとしたセルロプラスミンの濃度測定は

適した条件下で安定したデータが得られる。これにより、ウィルソン病のマス・スクリーニングは実践可能であり、その成果が期待される。

6. 文 献

- 1) 山口昭弘, 中澤恵実理, 石橋麻里子 他: 札幌市における Wilson 病の新生児マス・スクリーニング, 札幌市衛研年報 22, 66-71, 1995.
- 2) Alex P Mowat: Liver Disorders in Childhood, 317-329, Butterworth-Heinemann Ltd (1979)
- 3) 青木継稔: 銅代謝および先天性銅代謝異常に関する最近の進歩 - Wilson 病と Menkes 病を中心として -, 日本小児科学会雑誌 100, 567-570, 1996.
- 4) 扇谷陽子, 水嶋好清, 福士 勝 他: Immunonephelometry 及び Immunoturbidimetry による乾燥濾紙血の Apolipoprotein-AI 及び Apolipoprotein-B 測定方法の検討, 札幌市衛研年報 18, 86-93, 1991.
- 5) 日高裕介, 橋本好一, 中村史明 他: ベーリングネフェロメーター による免疫グロブリン, 補体, CRP, ASO, RF 測定法の検討, 臨床検査機器・試薬 20, 103-112, 1997.
- 6) 山田浩司, 外山美紀, 石井佐代子 他: 全自動免疫化学分析装置 BN による血清蛋白質の評価, 臨床検査機器・試薬 19, 213-222, 1996.
- 7) 井上 幸, 井山 茂, 柳原武彦: 全自動免疫化学分析装置ベーリングネフェロメータ (BN) による血清蛋白(IgG, IgA, IgM, C3c, C4, セルロプラスミン, ハプトグロビン, トランスフェリン, プレアルブミン, RBP, 1-アシッドグリコプロテイン)の測定性能の検討, 臨床検査機器・試薬 19, 699-708, 1996.

Newborn Screening for Wilson Disease by Nephelometry

Shosuke Nomachi, Yumika Miura, Yasuko Tagami, Masaru Fukushi, Yuji Sato, Kozo Fujita

In Sapporo, newborn screening for Wilson disease was carried out by measuring the concentration of ceruloplasmin(CP) in dry blood sample on filter paper. The CP measurement was measured by Nephelometry. This method could be performed simply and first, and could measure lower concentration of ceruloplasmin.

From July to September'99, 2,746 newborn babies were screened by this method. Eleven cases(0.40%) requested second samples because of the low ceruloplasmin value. However, all of them showed normal ceruloplasmin concentrations at the second test. We could not find any patients, but this method is considered to be useful for mass-screening for Wilson disease.