

抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたWilson病患者と
正常新生児の血清および濾紙血のセルロプラスミン値に関する研究
(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

藤岡芳実*、久保田純子*、清水教一*、青木継稔*
清水敬子**、冷牟田修一**

要約：抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により、正常新生児の血清および濾紙血中の総セルロプラスミン（以下T-Cpと略す）、ホロ型（活性型）セルロプラスミン（以下H-Cpと略す）を測定し、Wilson病患者（3歳以上）および健常成人と比較検討した。新生児の血清および濾紙血中のT-Cp、H-Cpは、成人に比べ有意に低値を示したが、Wilson病患者に比べて有意に高値であった。新生児の血清H-Cpと濾紙血中H-Cpは良い相関が見られた。Wilson病患者の新生児期の血清および濾紙血中のT-CpおよびH-Cpが低値であると仮定すれば、新生児期のマス・スクリーニングは可能である。

見出し語：Wilson病マス・スクリーニング、抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体
新生児濾紙血、総セルロプラスミン、ホロ型（活性型）セルロプラスミン

研究目的：抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により血清セルロプラスミン（以下Cpと略す）を測定し、幼小児期のH-CpはWilson病患者に比べ有意に高値であり、本方法によるWilson病スクリーニングが可能であることを昨年報告した。今回は、同方法を用いて新生児期の血清および濾紙血中のCpを測定

し、新生児期のCp測定によりWilson病のスクリーニングが可能かどうかについて検討した。

研究方法：東邦大学医学部附属大橋病院にて出生した満期正常分娩の新生児を対象とした。日齢4～7にheel cut採血により、毛細管、濾紙に血液を採取した。毛細管血を遠心分離し、得られた血清(n=9)および濾紙血(n=11)は測定まで4℃

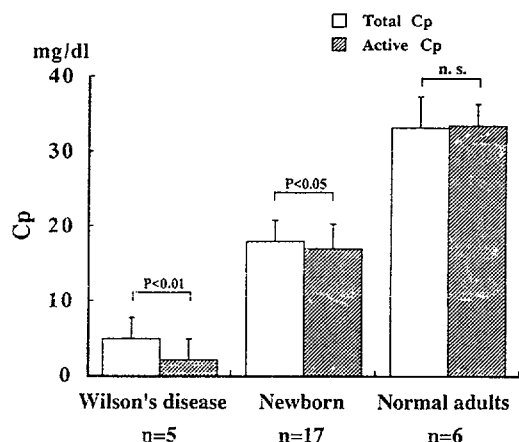
* 東邦大学医学部第2小児科学教室、**出光興産中央研究所

表1 新生児、成人およびWilson病患者の濾紙血と血清中のセルロプラスミン値の比較検討

		濾紙血		血清	
		ID 1	ID 2	ID 1	ID 2
新生児	Mean	18.0	17.0	20.3	20.0
	±SD	3.0	3.2	3.3	3.4
		(N=17)		(N=11)	
Wilson病	Mean	5.0	2.1	3.6	1.6
	±SD	3.0	2.8	1.4	1.0
		(N=5)		(N=9)	
成人	Mean	33.2	33.5	30.5	33.8
	±SD	4.1	3.0	3.9	4.0
		(N=6)			

図1

Total and active ceruloplasmin in blood on filter paper



にて保存し、3週間以内にT-CpおよびH-Cpを測定した。健常成人 (n=6) およびWilson病患者 (3~44歳、血清 n=9、濾紙血 n=5) からは静脈採血により同様にCpを測定した。抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体 (ID1 抗体と略す) は、Cpの蛋白部分を認識し、抗ヒトホロ型 (活性型) セルロプラスミンモノクローナル抗体 (ID2 抗体と略す) は、Cpのパラフェニレンジアミン (PPD) オキシダーゼの活性部分を認識する抗体である。ID1 およびID2 抗体を用いたサンドイッチELISA法にて測定した吸光度を、標準Cp溶液により作成した検量線を用いて定量化した。血液濾紙は、直径3mm をpunch out し、超音波法にて抽出し測定した。

結果：(1) 新生児のT-CpおよびH-Cp値

新生児のT-CpおよびH-Cp値は、毛細管血清と濾紙血の間には有意差はなかったが、毛細管血清の方が高値傾向を認めた。新生児の濾紙血において、

T-Cp値がH-Cp値より高い傾向を示したが有意差はなく、毛細管血清においては全く差がなかった (表1、図1)。

(2) Wilson病患者のT-CpおよびH-Cp値

Wilson病患者の血清および濾紙血中のCp値は、T-CpおよびH-Cp値共に著明な低値を示し、H-Cp値はT-Cp値に比較して、さらに低値を示した。

Wilson病患者の血中H-Cp値は、T-Cp値の平均約40%であった。Wilson病患者において、濾紙血Cp値の方が、血清より高い傾向であったが有意差はなかった (表1、図1)。

(3) 新生児・健常成人とWilson病患者とのT-CpおよびH-Cp値の比較

健常成人のT-Cp値およびH-Cp値は、血清と濾紙血の間には有意差はなく、約33mg/dl 平均であった。新生児および健常成人の血中Cp値は、T-Cp値およびH-Cp値には差がなかったが、Wilson病患者にのみT-Cp>H-Cpとなった。T-Cp値およびH-Cp値

は、健常成人と新生児の間には有意差があり、健常成人より新生児は低値であった。Wilson病患者のT-Cp値は、健常成人および新生児より著明に低く、H-Cp値はさらに低値であった($P < 0.001$)。

(4) 新生児濾紙血H-Cp値を指標とした場合のCut off 値の設定

新生児濾紙血H-Cp値は、平均値(M)が17.0mg/dlであり、SD値は3.2mg/dlである。M-2SD 値は9.0 mg/dl、M-3SD 値は7.4mg/dlである。一方、Wilson病患者濾紙血H-Cp値は、平均値(M)が2.1 mg/dl、SD値が2.8mg/dlである。M+2SD 値は7.7mg/dl、M+2.5SD 値は9.1mg/dl、M+3SD 値は10.5mg/dl である。

考察および結論：ヒトにおける新生児期は生理的に低Cp血状態にあるとされる²⁾。従って、新生児期におけるCp値を指標としたWilson病マス・スクリーニングは困難であろうと推定されてきた。新生児期の生理的低Cp血状態は、Cp蛋白として認識されるApo-CpとHolo-Cp ともに低値であることは従来法(ポリクローナル抗体)にて判明しており、肝におけるCp合成能の未熟性と説明されてきた。また、新生児肝Cp合成能の未熟性は、Holo-Cp 合成の未熟に起因することも推定されていた。今回の新生児Cp測定の結果より、新生児の血中に流出するCpは、ほとんど全てがHolo型であり、Apo 型の存在は皆無か、あっても極僅かであると考えられた。従って、新生児肝における細胞内Cp合成は、成人期より低いが Apo→Holoの合成が行われていると推定される。新生児であっても、Apo-Cpは、血中には流出しないことが判明した。

一方、Wilson病患者において、血中Cp値は著しく低値であり、T-CpばかりでなくHolo型がより低

値であった。この結果は、Wilson病において末梢血中にApo 型Cpが流出していることであり、本症に特徴的な所見と考えられた。Wilson病患者の濾紙血H-Cp値が、T-Cp値より低値であることは、本症をマス・スクリーニングする際に大変有利である。従って、本症をマス・スクリーニングするためには、濾紙血H-Cp値を指標にするELISA 法は有用である。しかし、Wilson病患者の肝細胞におけるCp合成の低下、特にHolo-Cp 合成能の著しい低下の機序は不明であり、一部の研究者によれば、肝銅蓄積と密接な関係があるとの報告もあるためWilson病患者の新生児期の血中Cp値が健康新生児と比較して、既に著明な差があるかどうかという疑問が残る。1993年末に、Wilson病責任候補遺伝子がクローニングされ、ATPase関連銅輸送蛋白酵素であるとされ、近いうちに本症の銅蓄積機序やCp合成阻害の機構が明らかにされるであろう。

いずれにしろ、Wilson病患者が新生児期から低Cp血、特に低Holo-Cp 血が存在すれば本法により新生児濾紙血を用いたスクリーニングは十分に可能であると結論した。新生児濾紙血のH-CpのCut off 値は、M-2.5SD が適当ではないかと考えられるが、Wilson病患者で比較的高値傾向を示す患児が存在することも考慮すれば、M-2SD が適当かもしれないと考える。

参考文献：

- 1) Hiyamuta S., Shimizu K. and Aoki T.: Early diagnosis of Wilson's disease. *Lancet*, 342: 56-57, 1993.
- 2) 青木継稔：ウィルソン病。東京、星和書店、1984.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により、正常新生児の血清および濾紙血中の総セルロプラスミン(以下 T-Cp と略す)、ホロ型(活性型)セルロプラスミン(以下 H-Cp と略す)を測定し、Wilson 病患者(3 歳以上)および健常成人と比較検討した。新生児の血清および濾紙血中の T-Cp、H-Cp は、成人に比べ有意に低値を示したが、Wilson 病患者に比べて有意に高値であった。新生児の血清 H-Cp と濾紙血中 H-Cp は良い相関が見られた。Wilson 病患者の新生児期の血清および濾紙血中の T-Cp および H-Cp が低値であると仮定すれば、新生児期のマス・スクリーニングは可能である。