

新生児濾紙血を用いた抗ヒト活性型セルロプラスミンモノクローナル抗体ELISA法による

Wilson病マス・スクリーニングの実施成績

(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)

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

要約：新生児濾紙血中のホロセルロプラスミン定量によるWilson病のマススクリーニングを東邦大学第二小児科および都立衛生研究所の2施設において施行した。それぞれの平均値は17.78mg/dlと19.6mg/dlであり、SDは4.18および6.07であった。東邦大学の結果より、7mg/dl(-2.5SD)にcut off値を設定した場合、再検率1.08%となり、適当と思われた。また、陽性例に関しては確定診断するために、2-3年のfollow upが必要であると考えられた。

見出し語：Wilson病マス・スクリーニング，抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体，血清ホロセルロプラスミン定量

研究目的：先天性銅代謝異常症の代表的疾患であるWilson病は，治療および発症予防の可能な数少ない代謝異常症の一つである。また，出生3.5-4.5万人に一人と，現在マス・スクリーニングの対象となっている疾患の一部よりもその頻度は高い。これらのことより，本症のマス・スクリーニングの必要性が提唱されている。筆者らは，本症患者の約95%に低セルロプラスミン血症が認められることに注目し，抗ホロセ

ルロプラスミン・モノクローナル抗体を用いて，新生児濾紙血中のホロセルロプラスミン定量によるWilson病のマス・スクリーニングを実施した。その成績を報告するとともに，適正なcut off値の設定および陽性者のfollow up期間等についても検討を加えた。

対象および方法：2施設において測定を行った。東邦大学第二小児科学教室における185例，お

*東邦大学第二小児科学教室，**東京都立衛生研究所，***出光興産中央研究所

よび東京都立衛生研究所における633例について検討した。生後4-9日の新生児より濾紙上に採血した。濾紙は4°Cに保存し、3週間以内に測定を行った。測定には、オキシダーゼ活性を持つセルロプラスミン（ホロセルロプラスミン）のみを認識する抗ホロセルロプラスミン・モノクローナル抗体ID-2を用いた¹⁾。乾燥血液濾紙より、超音波を用いて血液を抽出した。それらの血液に対しサンドイッチELISA法を施行し、血中ホロセルロプラスミン量を測定した¹⁾。96 wellのプレートに、抗ヒトセルロプラスミン・モノクローナル抗体であるID-1抗体を固定し、ブロッキングを行った。ここに上記サンプルを加え、全セルロプラスミン蛋白をトラップした。次にペルオキシダーゼにて標識されたID-2抗体を加え、30°C 1.5時間反応させた。これに反応基質であるオルトフェニレンジアミン、クエン酸リン酸buffer、過酸化水素を加えOD波長492nmを測定し、検体中のホロセルロプラスミン量を測定した。

結果：東邦大学第二小児科における185例においては、平均値が17.78mg/dl, SDは4.18であり、最低値は5.9mg/dl, 最高値は28.5mg/dlであった。東京都立衛生研究所における633例を検討した結果、平均値およびSDはそれぞれ19.6mg/dlと6.07であった。また、最低値は3mg/dl, 最高値は45.2mg/dlであった。

各ホロセルロプラスミン値における例数を施設ごとに検討した。東京都立衛生研究所の結果にては、かなり広い範囲の正規分布を示していた（図1）。

東邦大学第二小児科における結果は、その範囲はやや狭いものの、やはり平均値である17mg/dl台にピークを持つ正規分布であった（図2）。

測定したホロセルロプラスミン値において性別によって有意な差は認められなかった。

在胎週数にて比較した場合には、在胎期間が長い症例ほどセルロプラスミンは高い値を示した（表1）。また、生下時体重とセルロプラスミン値の間には特に相関は認められなかった。

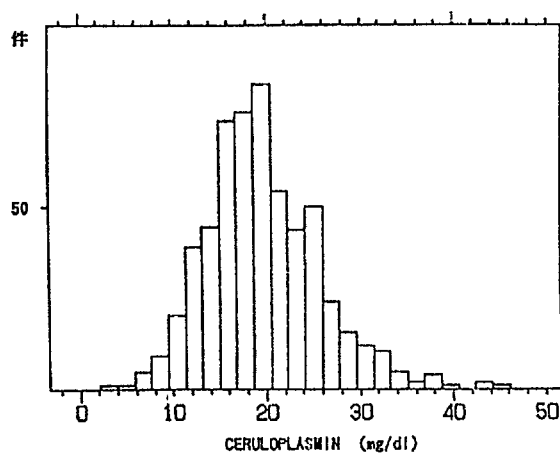


図1. 東京都立衛生研究所における新生児乾燥血液濾紙血中のホロセルロプラスミン値

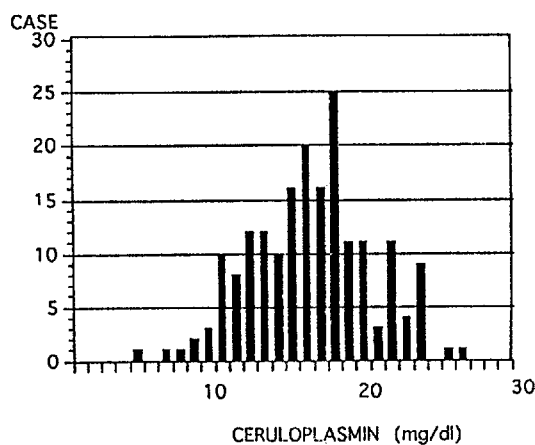


図2. 東邦大学第二小児科学教室における新生児乾燥血液濾紙血中のホロセルロプラスミン値

表1. 在胎週数によるホロセルロプラスミン値

在胎週数	≤35週	36 ~ 39週	40週≤
N	21	128	89
MEAN mg/dl	17.95	21.03	23.56

考察：東邦大学第二小児科学教室および東京都立衛生研究所における結果にて、それぞれの平均値にピークを持つ正規分布を得た（図1, 2）。両施設間におけるSDおよび最高値・最低値の差は、症例数の違いによると考えられる。また、両者の平均値にも若干の差が認められるのは、両施設においてそれぞれのスタンダードを用いているためであると思われる。

各ホロセルロプラスミン値における累積%より、再検率および cut off値を検討した(表2)。東邦大学第二小児科学の結果より cut off値を求めた場合、-2.0SDである9mg/dlにては、累積%は2.7%、-2.5SDとなる7mg/dlにおいては1.08%であった。目標とする再検率を1%前後とすると、-2.5SDである7mg/dlに cut off値を設定するのが妥当であると考えられる。陽性者に関しては、肝生検による確定診断が可能となる年齢等を考慮し、2-3年のfollow upが必要であると思われる。

このマス・スクリーニングシステムの問題点としては、Wilson病患者が新生児期においても低セルロプラスミン血症を示すかどうか証明されていないことである。本症におけるホロセルロプラスミン合成障害の機序はいまだ不明である。最近、Wilson病の候補遺伝子がクロ

ーニングされた²⁾³⁾⁴⁾。今後は、この遺伝子を用いた本症の発症機序の解析、そしてセルロプラスミン合成・分泌のメカニズムについての詳細な検討が期待される。

表2. 新生児乾燥濾紙血中のホロセルロプラスミン値の累積%

Cp (mg/dl)	都立衛生研		東邦大小児科	
	件数	累積 %	件数	累積 %
3	1	0.16	0	0
4	1	0.32	0	0
5	1	0.48	1	0.5
6	2	0.8	0	0.5
7	2	1.12	1	1.08
8	8	2.38	1	1.62
9	5	3.12	2	2.7
10	14	5.38	3	4.32

参考文献：

1. Hiyamuta S. et al. Early diagnosis of Wilson's disease. *The Lancet*, 1993; 342: 56-57.
2. Yamaguchi Y. et al. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 197: 271-277.
3. Bull PC. et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet.*, 1993; 5: 327-337.
4. Tanzi RE. et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet.*, 1993; 5: 344-350.



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: 新生児濾紙血中のホロセルロプラスミン定量による Wilson 病のマスキングを東邦大学第二小児科および都立衛生研究所の 2 施設において施行した。それぞれの平均値は 17.78mg/dl と 19.6mg/dl であり, SD は 4.18 および 6.07 であった。東邦大学の結果より, 7mg/dl (-2.5SD) に cut off 値を設定した場合, 再検率 1.08% となり, 適当と思われた。また, 陽性例に関しては確定診断するために, 2-3 年の follow up が必要であると考えられた。