

Wilson病のマス・スクリーニングに関する研究

(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患と
その実施年齢およびスクリーニング法に関
する研究)

北川 照男* 大和田 操* 鈴木 健**

【要約】

治療可能な先天性代謝性蓄積症Wilson病の早期発見のためのマス・スクリーニングの方法について検討した。本年度は涙紙血液中のセルロプラスミンの分析方法について、P-フェニレンジアミン法、免疫プレート法、Ouchterlony法およびELISA法を用いて検討した結果、マス・スクリーニングに使用する方法としてはELISA法が最も適していると結論された。

【見出し語】

Wilson病, セルロプラスミン, ELISA法

【研究目的】

肝、脳、角膜などに銅の蓄積を認める先天性銅代謝異常症Wilson病の一次障害は未だ不明であるが、殆どどの症例において血清セルロプラスミン(ceruloplasmin, 以下CP)銅が低下し、尿中への銅排泄増加が認められる。本症は放置すれば肝硬変、錐体外路症状、知能低下を呈する予後不良な疾患であるが、早期にD-ペニシラミンなどキレート剤を使用して体外に銅を排泄させることにより症状の発現を予防することが可能なため“治療可能な代謝異常症”として注目されてきた。本症は我が国でも比較的頻度が高い代謝異常症¹⁾で、無症状のうちに発見して早期治療を行う

ことが必要と考えられたため、これまでもマス・スクリーニングの試みがなされてきたが、検査方法、採血時期などに様々な問題が残されている。Wilson病のマス・スクリーニングの方法および採血時期を検討することが本研究の目的である。

【対象】

Wilson病患者4例、幼児250例、学童300例から採取した涙紙血を材料とした。Wilson病患者はいずれもp-phenylenediamine(PPD) oxidase法および免疫法によって血清CPの著しい低下を確認した症例である。

【研究方法】

1. p-phenylenediamine(PPD) oxidase法

* 日本大学医学部小児科

Dept. of Pediatrics, Nihon Univ. School of Medicine.

** 東京都予防医学協会

0.2M酢酸緩衝液pH4.0に溶解した0.5% PPD溶液250 μ lをディンプルトレーに分注し、径3mmの濾紙血ディスク1枚を加えて37°Cで1~6時間反応させ、0.3% NaNO₂ 50 μ lを加えて反応を停止させて530nmにて比色した。盲検には予めNaNO₂を加えたPPD溶液にディスク1枚を加えた検体を使用した。また、血清50 μ lを用いて10-60分反応させたPPD oxidase活性と濾紙血における値とを比較した。

2. Immunoplate法

1.5% Difcoバクト・アガーを10mM PBS-pH7.0に溶解し、CP抗血清(シグマ, ヤギ)を加えてシャーレに流し固める。径3mmのディスクを1枚ずつ置いて室温で1夜放置したのちに生食水で10回洗滌する。次に1%アミドブラックにて染色し、3%酢酸で数回洗滌したのちに濾紙血周囲の沈降環を肉眼で判定する。

3. Ouchterlony法

0.5% Difcoバクトアガー, 0.5%アガロースをペロナール緩衝液50mM, pH8.6に溶解し、7.5×23cmの角型シャーレに流し固め、径3mm 7穴の孔を3×10箇所穿つ。中央にCP抗血清(シグマ, ヤギ)を、周囲の6穴には径3mmの濾紙血ディスク1枚を埋め込み、ペロナール緩衝液10 μ lを注入し、室温で6時間反応させた後、沈降線を肉眼で判定する。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法

抗ウサギIgGヤギ抗血清(シグマ)をコーティングしたマイクロプレートを用いて、図1に示す手順に従って濾紙血中のCP蛋白を定量した。

【結果】

1. PPD法

PPDを基質としてCPのcopper oxidase活性を検討する方法は、従来から血清CPの検査法として広く使用されており、この方法を濾紙血中のCPの検出法に応用する試みが我が国では報告されていた。そこで我々もこれを試みたが、血清におけるcopper oxidase活性が殆んど認められないWilson病患者4例から採取した濾紙血を用いてもPPDの酸化が進行し、反応液の530nmにおける吸光度

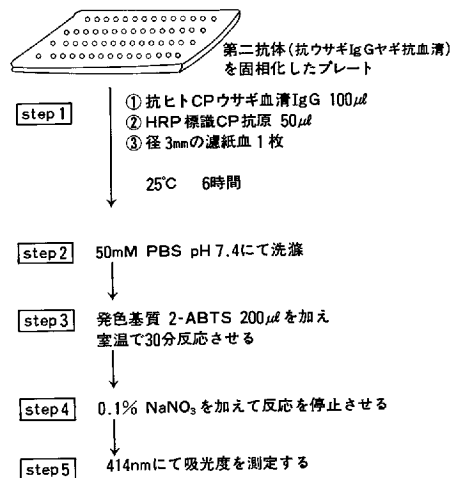


図 ELISA法による濾紙血セルロプラスミン測定法

の明らかな増加が認められた。このことは、赤血球中にはcopper oxidase以外にもPPDを酸化する物質(蛋白?)が存在することを示唆しており、本法は濾紙血CPの測定法としては適さないと考えられた。

2. CPの免疫学的検出法の比較

前に述べた3種類のCP蛋白の検出法の何れを使用しても濾紙血中のCPは検出可能であったが、各方法の比較は以下の通りである。

1) immunoplate 法：他の2法に比べて50~100倍の抗血清を必要とし、沈降環の判定のためのプレートの洗滌にかなりの時間（実際には4~5時間）を要するという欠点を認めた。

2) Ouchterlony 法：1プレート（150検体）を作製するのに1時間を要したが、6時間で沈降線が明瞭となり1日で判定が可能であった。しかも、使用する抗血清量が微量で良い利点があるが、血色素の溶出のために判定には刷れが必要であった。

3) ELISA 法：測定手技が容易で反応時間も短かく、しかもCP蛋白を定量的に測定できるのでマス・スクリーニングには極めて有用と考えられた。

3. ELISA 法による CP 測定成績

本法では径3mmの血液ディスク1枚を使用して5~120mg/dlの範囲のCPを定量的に測定することが可能であり、4例のWilson病患者の滷紙血中CPはいづれも測定感度以下であり、患者と正常群との鑑別は容易であった。また本年度に施行した学童および保育園児の滷紙血CP測定では全例が正常域に分布していた。

【考察】

Wilson病のマス・スクリーニングに関する検討として、本年度は滷紙血中CPの測定方法について検索した。上述のように、滷紙血CPの測定法としてはcopper oxidase活性をみるよりもCP蛋白を免疫学的方法によって検出する方が適していると考えられ、中でもELISA法が最も有用と思われた。

本症のマス・スクリーニングに関しては、時期の問題、方法の問題など、今後検討しなければならない問題が多いが、これからもより良い方法の開発を課題として検討してゆき

たい。

文献

- 1) 大和田 操ほか. 我が国における先天性代謝性蓄積症の実態. 産婦人科の世界. 37 9-15, 1985.



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】治療可能な先天性代謝性蓄積症 Wilson 病の早期発見のためのマス・スクリーニングの方法について検討した。本年度は炉紙血液中のセルロプラスミンの分析方法について、p-フェニレンジアミン法,免疫プレート法,Oucherlony 法および ELISA 法を用いて検討した結果,マス・スクリーニングに使用する方法としては ELISA 法が最も適していると結論された。