

## Wilson 病 マスクリーニング法の開発および スクリーニング時期設定に関する研究

(分担研究：マ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)

青木継稔, 四宮雅子, 原まどか, 佐藤裕美

**要約：**今回は、FITC 標識ヒトセルロプラスミン抗体およびラテックス粒子コーティングヒトセルロプラスミン抗体を用いて蛍光法(以下、PCFIA法と略す)による血液濾紙中セルロプラスミン測定を行い、Wilson 病マスクリーニングのための新しい方法を開発した。PCFIA法により、1歳から成人に至る3,925名の血液濾紙を用い検討し、血中セルロプラスミン値 cut off point を  $15 \text{ mg/dl}$  とすると再検率は1.04%となった。検討中に、3歳男児例のWilson 病1例を発見することができた。マスクリーニング時期は、平成2年度に実施したWilson 病全国実態調査により集計した425例中最少発症年齢3歳であり、さらに激症肝炎型(腹部型Wilson 病)最小発症年齢5歳11か月であったことより、昨年度(平成元年度)の研究成績と考え併せて3か月以上5歳までの間が適当と考えた。

**見出し語：** Wilson 病 マスクリーニング 血液濾紙によるセルロ・プラスミン測定、PCFIA法 (Particle-Coating Fluoro-Immuno-Assay)、乳幼児健診

**研究目的：** Wilson 病は出生約30,000～36,000人に1人といわれ、現在わが国において実施されているフェニルケトン尿症マスクリーニングによる発見頻度の2～2.5倍と多い。また、本症はD-ペニシリン等の銅キレート剤の経口投与により発症予防あるいは治療可能な疾患である数少ない先天代謝異常の1つである。本症の3～5%は血中セルロプラスミン値が  $15 \text{ mg/dl}$  以上を示すといわれるが、患者の95%以上は著明な低セルロプラスミン血が認められることにより、本症のマスクリーニング法として血清セルロプラスミンを測定することに着眼し筆者らは研究してきた。今年度(平成2年)は、簡便に大量処理できる方法として血液濾紙  $\phi 3 \text{ mm}$  discを用いラテックス粒子およびFITC標識ヒトセルロプラスミン抗体による蛍光法(PCFIA法)を開発した。さらに、Wilson 病全国患者実態調査を行い、Wilson 病最少発症年齢や本邦におけるWilson 病患者の血清セルロプラスミン値の分布等を検討し、本症マスクリーニング時期設定を行った。**対象および方法：**保健所における3歳児を中心とする健診の場に来所した児、保育園、幼稚園児等にて親の理解と協力の得られたもの、当科あるいは関連病院において外来あるいは入院し、今までに銅代謝異常を指摘されたことがなく協力を得られた男子3,925名の血清および血液濾紙を検査対象とした(表1)。さらに新生児86

名およびWilson 病7例を加え検討した。各年齢区分別対象数は表1に示した。対象者に対する血液採取法は、肘静脈血採血あるいは耳朶から毛細管により採血した。血液濾紙は室温乾燥の $-20^\circ\text{C}$ にて保存した。血清セルロプラスミン測定は免疫プレート法を主に、一部はラテックス抗体比濁法にて行った。血液濾紙セルロプラスミン測定は、新しい方法を開発した。本法の原理は筆者らが約10年以上前に開発した方法を大量処理可能となり、簡便に実施できるよう改良したものである。ラテックス粒子  $\phi 0.84 \mu\text{m}$  のものにヒトセルロプラスミン抗体(家兎)をコーティングし、さらにヒトセルロプラスミン抗体にFITCを標識した二抗体法により血液濾紙溶出(抽出)液中セルロプラスミンを測定するものである。96穴の各穴底部に  $\phi 0.84 \mu\text{m}$  のラテックス粒子が吸着されるmembraneを付着したプラスチック製の特殊加工したものを用い、membraneを通過した溶液は吸引し3回洗浄し、membraneに付着したFITC付着ラテックス粒子の蛍光強度を自動読み取り可能な仏・パンテックス社製フルオロメーターにて測定した(図1)。

**結果：**(1)PCFIA法の予備実験：既知血清セルロプラスミン濃度の血清を濾紙に吸着させてPCFIA法蛍光強度測定を行ったところ、 $r=0.949$ と高い相関があり、検量線とした。既知血清セルロプラスミン濃度血清とそれぞれに対応する血液濾紙によるPCFIA法セルロプラスミン測定値の間に  $r=0.920$ と高い相関が得られたため、対象者から作製した血液濾紙  $\phi 3 \text{ mm}$  discのものをを用いてPCFIA法を実施した。

(2)血液濾紙によるPCFIA法とセルロプラスミン cut off point :

3,925名の血液濾紙PCFIA法セルロプラスミン測定の結果、血中換算セルロプラスミン値10mg/dl以下のもの1.04%、15mg/dl以下のもの4.2%であった。再検にて、15mg/dl以下のものは0.81%となった。32名の血液濾紙PCFIA法15mg/dl以下と判断したものの同時採血した血清セルロプラスミン値は、1例を除いてすべて15mg/dl以上であった。1例は、血清セルロプラスミン値5mg/dl以下にて精査の結果Wilson病であった。この例は3歳男児であり家系内にWilson病患者が数名いた。(3)Wilson病全国調査

による最少発症年齢の検討：425例のWilson病症例が集計され、最少発症年齢は3歳であり4例いずれも肝型であり、激症肝炎型最少発症年齢は5歳11カ月であった。(4)Wilson病全国調査による血清セルロプラスミン値の検討：425例中初診時血清セルロプラスミン値の記載のあった353例について検討した結果、血清セルロプラスミン値10mg/dl以下の症例は87%であり、15mg/dl以下の症例は約96%という成績であった。逆に、15mg/dl以上の血清セルロプラスミン値を示したWilson病症例は約4%存在するという結果であった。

考察および結論：(1)セルロプラスミン測定によるWilson病マスキング：筆者らは、

表1. 検査対象および血清セルロプラスミン値区分別頻度

|         | 検査対象  | 血清セルロプラスミン値 (mg/dl) |         |         |         |         |       |
|---------|-------|---------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
|         |       | 0-4.9               | 5.0-9.9 | 10-14.9 | 15-19.9 | 20-24.5 | 25以上  |
| 1~2歳    | 279   | 0                   | 0       | 0       | 2       | 34      | 243   |
| 2~3歳    | 196   | 0                   | 0       | 0       | 3       | 18      | 175   |
| 3~4歳    | 1,833 | 1                   | 0       | 0       | 24      | 51      | 1,757 |
| 4~5歳    | 520   | 0                   | 0       | 0       | 6       | 37      | 477   |
| 5~6歳    | 343   | 0                   | 0       | 0       | 7       | 25      | 311   |
| 6~7歳    | 37    | 0                   | 0       | 0       | 0       | 3       | 34    |
| 7~9歳    | 29    | 0                   | 0       | 0       | 1       | 2       | 26    |
| 9~11歳   | 18    | 0                   | 0       | 0       | 0       | 3       | 15    |
| 11~15歳  | 31    | 0                   | 0       | 0       | 0       | 6       | 25    |
| 成人      | 639   | 0                   | 0       | 0       | 8       | 29      | 632   |
| 合計      | 3,922 | 1                   | 0       | 0       | 51      | 208     | 3,695 |
| 新生児     | (86)  | 2                   | 26      | 51      | 7       | 0       | 0     |
| Wilson病 | (7)   | 4                   | 3       | 0       | 0       | 0       | 0     |

毛細管血清を用いるRavin法変法(PPD Oxidase法), ラテックスコーティング抗体比濁法、血液濾紙によるPPD Oxidase法やFITC標識抗血清法を開発してきた。今回のPCFIA法は、ラテックス粒子コーティングしたヒトセルロプラスミン抗体とFITC標識ヒトセルロプラスミン抗体の組み合わせによる二抗体法を血液濾紙に応用したものであり有用性は高いと結論する。今回は、cut off pointを15mg/dlとした場合の陽性率が4.2%と高く次年度はもう少し検討する余地がある。しかし、本法にて1例のWilson病が見出された意義は大きい。(2) Wilson病と血清セルロプラスミン値：全国患者実態調査にて血清セルロプラスミン値15mg/dl

図2. 血清セルロプラスミン(免疫拡散法)値とBlood disc・PGFIA法との比較

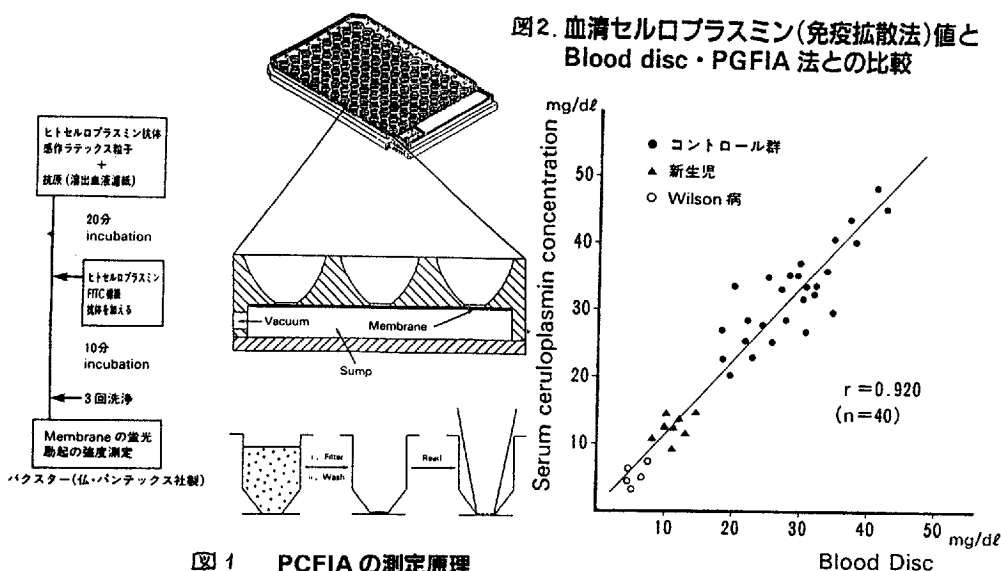


図1 PCFIAの測定原理

表2. Cut off point の設定

| 15 mg/dℓの場合 |   |      |       |
|-------------|---|------|-------|
|             |   | 確定診断 |       |
|             |   | +    | -     |
| スクリーニング     | + | 1    | 165   |
| テスト所見       | - | 0    | 3,760 |

Specificity =  $\frac{165}{3,760 + 165} \times 100 = 4.2\%$   
n = 3,925

| 10 mg/dℓの場合 |   |      |       |
|-------------|---|------|-------|
|             |   | 確定診断 |       |
|             |   | +    | -     |
| スクリーニング     | + | 1    | 41    |
| テスト所見       | - | 0    | 3,884 |

Specificity =  $\frac{41}{3,884 + 41} \times 100 = 1.04\%$   
n = 3,925

dℓ 以上のWilson病患者は3.7%  
20mg/dℓは2.0%存在していた。この成績はScheinbergら<sup>2)</sup>やGibbs・Walscheの成績より低率であるが興味ある結果であり、低セルロプラスミン血を指標にWilson病をマスキングするとき、3~5%の見逃がしを覚悟する必要がある。

③セルロプラスミン値 cut off point : 健康対象者の場合15mg/dℓ以下の者は1例(Wilson病と判別した3歳児)を除いて皆無であったこと、Wilson病患者全国集計成績より15mg/dℓが適当と判断した。(4)Wilson病マスキング実施時期(実施対象年齢): 平成元年度(昨年)の研究結果より3カ月以上、5歳の間が適当と考える。採血条件や他の疾患のスクリーニング(例、高コレステロール血症)との組み合わせも考慮

する必要がある。乳幼児健診は行政的に3・4カ月、1歳6カ月、3歳児にて全国的に実施されているので、耳朶や指尖による血漬濾紙採血であれば郵のインフォームド・コンセントも取り易い。マスキングから確定診断のための精密検査を考慮すれば、本症は3歳が適当かも知れない。

最後に本研究について多大なご助言、ご協力頂いたエス・アール・エル八王子ラボラトリーセンターの연구원の方々に感謝の意を表す。

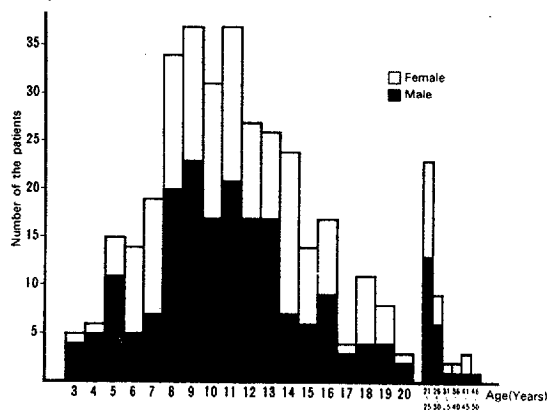
## 文 献

1. Aoki T and Nakahashi M. Lancet II:1140

表3 Wilson病初診時における血清中セルロプラスミン値

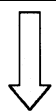
| Ceruloplasmin concentration in serum, mg/100ml | Number of the cases (%) |               |               |               |
|------------------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 0—4.9                                          | 216<br>(61.2)           | 307<br>(87.0) | 340<br>(98.0) | 349<br>(98.0) |
| 5.0—9.9                                        | 91<br>(25.8)            |               |               |               |
| 10.0—14.9                                      | 33<br>( 9.4)            | 39<br>(11.0)  |               |               |
| 15.0—19.9                                      | 6<br>( 1.7)             |               |               |               |
| 20.0—24.9                                      | 3<br>( 0.9)             | 7<br>( 2.0)   | 13<br>( 3.7)  | 7<br>( 2.0)   |
| 25.0<                                          | 4<br>( 1.1)             |               |               |               |
| Total                                          | 353<br>(100)            |               |               |               |

図3 日本におけるWilson病の発症年齢と頻度



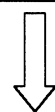
1977,

2. Scheinberg, I and Stemlieb, I: Wilson's disease, WB. Saunders, 1984.
3. Gibbs, K and Walsche, J M: Quart. J. Med., 48: 447 - 463, 1979.
4. 青木継稔、原まどか: Wilson病マスキングの実施年齢に関する研究、厚生省心身障害研究、「代謝疾患、内分泌疾患等のマスキング、進行阻止及び長期管理に関する研究」(主任研究者: 黒田泰弘)、平成元年度研究報告書、p 172 - 174, 1990.



## 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:今回は,FITC 標識ヒトセルロプラスミン抗体およびラテックス粒子コーティングヒトセレロプラスミン抗体を用いて蛍光法(以下、PCFIA 法と略す)による血液濾紙中セルロプラスミン測定を行い、Wilson 病マススクリーニングのための新しい方法を開発した。PCFIA 法により、1 歳から成人に至る 3,925 名の血液濾紙を用い検討し、血中セルロプラスミン値 cut off point を 15 mg/dl とすると再検率は 1.04%となった。検討中に、3 歳男児例の Wilson 病 1 例を発見することができた。マススクリーニング時期は、平成 2 年度に実施した Wilson 病全国実態調査により集計した 425 例中最少発症年齢 3 歳であり、さらに激症肝炎型(腹部型 Wilson 病)最小発症年齢 5 歳 11 か月であったことより、昨年度(平成元年度)の研究成績と考え併せて 3 ヶ月以上 5 歳までの間が適当と考えた。