

Wilson病のマス・スクリーニングに関する研究(2)

— ELISA法による汙紙血中セルロプラスミン

測定法および採血時期の検討—

(分担研究：マス・スクリーニングの新しい対象疾患とその
実施年令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：Wilson病の早期発見のためのマス・スクリーニング方法および採血時期について検討した。汙紙血中のセルロプラスミン(CP)の測定法としてELISA法を使用した。本方法は再現性が良く、患者と正常群とを明確に鑑別することが可能であった。また、新生児期から経時的に血中CPを追跡した結果、生後12週以降であれば、本症のスクリーニングは可能と考えられた。

見出し語：Wilson病, セルロプラスミン, ELISA法

研究目的：薬物療法が可能な先天性代謝異常症としてWilson病は代表的な疾患であり、早期に治療を開始すれば症状の発現が予防され、しかもその発生頻度は我が国でも比較的高いので、マス・スクリーニングの対象として取り上げられるべき疾患と考える。我々は本症の血清で低下しているセルロプラスミン(CP)を、汙紙血を用いてELISA法により測定する方法を開発し、昨年度の本研究班において報告したが、血清CP濃度は健常児であっても新生児期には低値を示すことが明らかにされており、現行の新生児マス・スクリーニングシステムに加えることはできない。我々が開

発したELISA法によるCPの測定法がWilson病のスクリーニング法として適切であるか否か、および、本症のマス・スクリーニングのための採血時期を如何にすべきかを検討する目的で以下の研究を行った。

対象：Wilson病患者4例、新生児期から治療を行っているPKUおよび良性高フェニアラニン血症(HPA)計7例、Wilson病以外の慢性疾患で定期的に来院している患者5例および新生児320例、幼児250例、学童2500例から採取した汙紙血を対象とした。

方法：抗ウサギIgGヤギ抗血清を固相化したマイクロプレートに、抗ヒトCPウサギIgG

* 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 (Tokyo Metropolitan Health Survice Association)

血清100 μ l, ペルオキシダーゼ標識CP抗原50 μ l, 直径3mmの沓紙血1枚を加え, 25℃で6時間反応させた後に沓紙および反応液を除きプレートを50mMPBS pH7.4で3回洗滌する。次いで, 発色試薬ABTS 200 μ lを加えて室温で30分反応させ, 0.1% NaNO₃を加えて反応を停止させた後に, マイクロプレートリーダー (インターメッド社製) を用い414nmの吸光度を測定した。

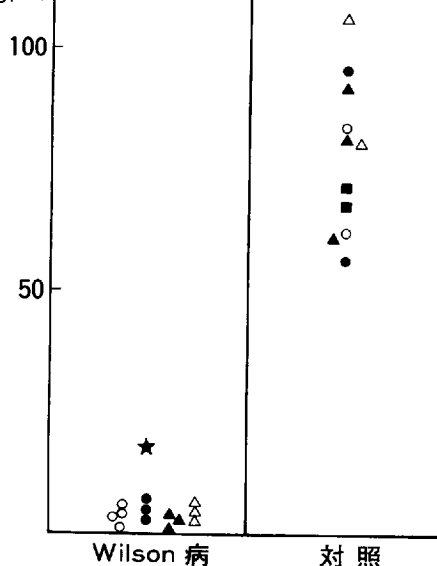
標準CP沓紙は, ヘパリン採血後, 血球と血漿を分離し, 血球は数回生理食塩水で洗滌し, 血漿に含まれるCPをアフィニティーカラムで除いた血漿と合せ, シグマ社製CPを一定量添加して作製した。

結果

1) ELISA法の再現性

p-phenylenediamine法および免疫拡散法により血清CPの著明な低下を示したWilson病患者4例および, Wilson病以外の代謝性疾患で定期的に通院している5例の患者から来院時に採取した沓紙血のCPを, 時期をちがえて測定した結果は図1に示す通りである。

図1. ng/dl



4例のWilson病患者においては, いずれの測定においても0~8 ng/mlの値を示していた。Wilson病以外の患者では, 3~6カ月を隔てて測定しており, 同一患者においてもその測定値にかなりのバラツキが認められるが, これは, 本法がもつ技術上の欠点による計算誤差と考えられる。即ち, 本法では, CP濃度の低い場合に414nmの吸収が増加し, CP濃度が高い場合に吸光度が弱くなる方法で, 低濃度に照準を合せて測定条件を設定した場合には, 高濃度領域の計算上の誤差が大きくなるものと考えられる。しかし, いずれにしても, Wilson病以外の検体では常に50ng/dlをこえており, 絶対値にバラツキはあっても, 患者の鑑別は容易であると考えられる。また★印の1例は肝機能異常を示した3歳男児の検体であり, 本例ではPPD法と免疫拡散法による血清CP値も正常域より低値を示していたので現在, 尿中銅排泄を測定中である。

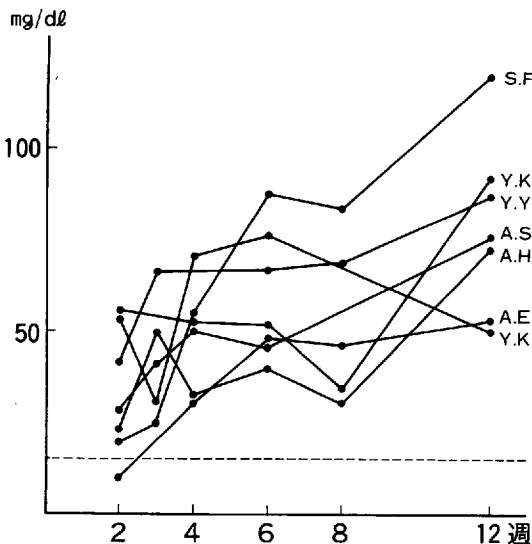
2) 新生児, 幼児, 学童のCP値

日令5の新生児の沓紙血中CP値は0~50 ng/dlに分布し, 25ng/dl以下を示す例が約50%を占めていたのに対し, 4~5歳の保育園児では25~125ng/dlに分布しており, その平均は75ng/dlであった。また, 2500例の小中学生ではCP値が幼児と同様に25~125ng/mlに分布し, 65ng/dlをピークとした正規分布を示していた。また, 幼児において, CP値が25ng/dlを示した例が1%認められたが学童以後には1例もみられなかった。

3) 新生児期から生後12週までのCP値の追跡

新生児マス・スクリーニングで発見され, 直ちに食事療法が開始された5例のPKUおよび2例の良性HPA患者の沓紙血中CP値の追跡結果は図2のようである。生後2週で

図 2.



は7例中4例が30ng/dl以下であり、その中の1例は15ng/dl以下を示していた。また、個々の症例により多少の差はあるものの、生後12週では全例が40ng/dlに上昇しており、これ以後であれば本症のスクリーニングは可能と考えられた。

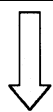
考察：以上述べたように、我々の開発したELISA法による浚紙血CP測定法は再現性が良く、Wilson病のマス・スクリーニング法として充分使用できる信頼度をもつ方法と考えられ、本法を使用すれば、CP濃度が10ng/dl以下の患者の全例が発見可能と結論し得る。もちろん、本症の中には正常下限の血清CPを認める例が存在すると報告されており、我々の経験した図1の★印の検体も、Wilson病である可能性が極めて高い例と考えられるため、現在検索中である。この例の浚紙血CP値は18ng/dlと計算され、他の4例の患者のCP値よりも明らかに高値であり、我々が本法で暫定的に設定したcut off値15mg/dlをこえている。しかし、同時に測定した一般

検体の中では、この検体のCP値が最低値であり、cut offの方法を絶対濃度によらず、パーセンタイルから判定すれば、必ず陽性として掬い上げられるものと考えられる。

ところで、Wilson病のスクリーニングには日令5の血液が不適當であることはすでに明らかにされているが、乳児期のCP値の変化については不明な点が多いように思われたため、新生児期から2～4週毎に追跡可能なPKU患者の検体を用いて、浚紙血中CPの推移を検討した。その結果、生後12週をすぎれば、正常域に達するものと考えられる成績を得た。もちろん、スクリーニングを実施する場合、どのような場所で誰が採血するのか、親の同意をどのように得るかなど、今後検討すべき課題は残されているが、我々の検討結果から、検査方法と採血時期については、ある程度の結論が得られたものとする。

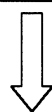
文 献

- 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:Wilson 病の早期発見のためのマス・スクリーニング方法および採血時期について検討した。炉紙血中のセルロプラスミン(CP)の測定法として ELISA 法を使用した。本法は再現性が良く、患者と正常群とを明確に鑑別することが可能であった。また、新生児期から経時的に血中 CP を追跡した結果、生後 12 週以降であれば、本症のスクリーニングは可能と考えられた。