

## ウイルソン病のマススクリーニング法の開発： モノクローン抗体を利用したE L I S A法について

(分担研究:遺伝性疾患をもつ小児の生活管理・指導に関する研究)

遠藤文夫, 松田一郎

**要約:** ウイルソン病は我が国においては出生約3万~3万5千人に1人と言われ、主要な遺伝性疾患の一つである。そこで本研究においては我々が今回開発したE L I S A法(セルロプラスミンの測定)が18ヵ月児を対象としたウイルソン病のスクリーニング法として適切であるか検討した。その結果、基本的にはE L I S A法でセルロプラスミンを測定するシステムを開発することができた。今回の結果を基に実用に向けたスクリーニング法の開発を続けて行きたい。

**見出し語:** ウイルソン病, セルロプラスミン, マスクリーニング, 酵素抗体法

### 【はじめに】

ウイルソン病は我が国においては出生約3万~3万5千人に1人と言われ、主要な遺伝性疾患の一つである。また本症はD-ペニシラミン等の銅キレート剤の経口投与により治療可能な疾患である。これらのことから、ウイルソン病の早期発見治療は重要と考えられている。そこで今回我々は、そのマス・スクリーニングの方法についての基礎的検討を行った。

この疾患を早期に診断するには尿中への銅排泄増加を調べるかあるいは血中のセルロプラスミンを測定してその異常低値を明らかにすればよいと考えられる。本研究においては我々が今回開発し

たE L I S A法(セルロプラスミンの測定)が18ヵ月児を対象としたウイルソン病のスクリーニング法として適切であるか検討する目的で以下の研究を行った。

### 【対 象】

保健所で1歳半児検診時に濾紙採血し、風乾後-20℃で保存したものを使用した。使用直前に室温に戻した。コントロール濾紙は正常成人全血で作成した。

### 【測定方法】

固相に抗セルロプラスニン山羊IgGを用い、

第2抗体として抗セルロプラスミンモノクロン抗体を用いた。精製山羊IgGで96穴のマイクロプレートのコートした。マウス腹水から精製したモノクロン抗体をペルオキシダーゼで標識して第2抗体として用いた。

濾紙からセルロプラスミンを1晩抽出し、希釈した後抽出液中のセルロプラスミンを測定した。発色基質としてオルトフェニリンジアミン(OPD)を用いた。吸光度はBIO-RAD Model 3550 MICROPLATE READERで測定し、記録した(490nm)。

## 【結果】

### 1. 濾紙上でのセルロプラスミンの安定性

について

検体として正常成人血で作成した濾紙を用いた。 $-80^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ の保存した検体中の値を $-80^{\circ}\text{C}$ を基準として比較した。期間は1ヵ月間保存してこの間の変化を見た。

### 2. 同一人から得た血清と濾紙血のセルプラスミン値の相関について良い相関が得られた。

### 3. 多数の検体の測定値の応用

我々は以上の結果をもとに1歳半児888名を対象に、濾紙血を用いたセルロプラスミン値の測定を行った。888検体を測定し、平均27.956、標準偏差10.324、最高値139.75、最低値3.94であり、ピークは20~25mg/dlとなった。また、男女間に明らかな差は見られなかった。セルロプラスミン値が10mg/dl以下のもの0.2%、15mg/dl以下のもの1.9%であった。再検査にて15mg/dl以下のもの0.34%となった。

## 【考察】

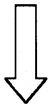
北川らの報告によると、セルロプラスミン値のcut off pointは3695名の健常者を対象とした場合、15mg/dl以下のものは1例(ウイルソン病と判明した3歳児)を除いて皆無であったことからウイルソン病患者全国集計成績より15mg/dlが適当とされている。しかし今回の研究では15mg/dl以下のものが0.34%であったが、この数値は予想より高く、これには測定上の問題が関与するものと考えている。

濾紙上のセルロプラスミンの劣化の程度が日数が経過するほど大きいことから、保存期間(2週間)の短縮、輸送中の試料の取り扱いの注意が必要と考えられた。一方で血清を試料とした場合には同じ測定法で測定した場合のセルロプラスミンの安定性が大きく増すことから採血・保存の方法を変更することも重要と考えられた。

一方、本研究で用いたELISA法をそのまま実際のマス・スクリーニングに応用するには、測定にかかる時間および手技の面で簡略化すべき点がある。一つの考えとして単一段階法による競合法ELISA等の開発を検討すべきと思われる。この研究の成果を基にさらに実用に耐えるセルロプラスミンの測定法の開発を進めて行きたい。

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、御協力いただきました熊本大学教育学部 永田憲行助教授、化学及び血清療法研究所 武田堅吾氏に厚く御礼申し上げます。



## 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：ウィルソン病は我が国においては出生約3万～3万5千人に1人と言われ、主要な遺伝性疾患の一つである。そこで本研究においては我々が今回開発したELISA法(セルロプラスミンの測定)が18ヵ月児を対象としたウィルソン病のスクリーニング法として適切であるか検討した。その結果、基本的にはELISA法でセルロプラスミンを測定するシステムを開発することができた。今回の結果を基に実用に向けたスクリーニング法の開発を続けて行きたい。