

ウイルソン病の濾紙血中のセルロプラスミン値
測定によるマススクリーニングの検討

(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に関する研究)

水嶋好清*，福士 勝*，菊地由生子*，高杉信男*，荒島真一郎**

要約：ウイルソン病を早期に発見するためのスクリーニング法として、濾紙血液を用いるセルロプラスミンのELISA法を開発した。本法は低濃度域まで再現性良く測定できた。従来の報告と同様にセルロプラスミンは新生児期から経時的に増大し、生後5日目で平均値は13.5mg/dlで生後6ヶ月頃で一定となった。ウイルソン病の患児15例のセルロプラスミン値は11例が2mg/dl以下，2例が3～5mg/dl，2例が10～15mg/dlであった。この値を新生児の分布に当てはめると、患児の80%以上が低値となり新生児期でも発見できる可能性があった。

見出し語：ウイルソン病，セルロプラスミン，ELISA法，マススクリーニング

【はじめに】

ウイルソン病は頻度も高く、治療可能な疾患としてマススクリーニングが期待される疾患である。本症の血清セルロプラスミン（以下CP）は健常者より低値を示し、CP測定によってスクリーニング可能かどうか検討されてきたが、検査法、採血時期などに様々な問題が残されている。

濾紙血液中のCPを高感度に再現性よく測定できるELISA法により測定を行い、ウイルソン病患児15例のCP値の分布と採血時期として新生児期にスクリーニング

可能かどうか検討を行った。

【対象】

未治療ウイルソン病患児3例、治療中の患児12例、正常新生児および1才までの乳児、正常成人について濾紙血液および一部の検体については血清を材料とした。

【方法】

1) CPの濾紙血によるELISA法
濾紙血液を用いるCPの測定は、二段階サンドイッチ法を原理としており、抗ヒトCPウサギ抗体（ダコ社）を固相したマイクロプレートを用いて行った。3mm濾紙を

*札幌市衛生研究所 (Sapporo City Institute of Public Health)

**北海道大学医学部小児科 (Dep. of Pediatrics, Hokkaido Univ. School of Med.)

緩衝液で200倍希釈し20 μ l分取し、緩衝液100 μ lを加え室温で1晩反応させる。4回洗浄し、抗ヒトCPヤギ抗体（EY社）HRP標識溶液100 μ lを加え室温2時間反応させる。4回洗浄し、OPD(20 μ g/well相当)を基質として酵素反応を行い、490/650nmの吸光度を測定し標準濾紙より濃度を算出した。

2) 血清CP, 銅測定法

血清CP測定のためのELISA法は血清10nlを用いて同様に行った。SRID法、レーザーネフェロ法、フェロオキシダーゼ法は市販のキットを用い、PPDオキシダーゼ法はRabin法により行った。血清銅測定はAbeら¹⁾の方法によった。

【結果】

1) ELISA法の標準曲線と再現性

濾紙血液を用いるCPの標準曲線の測定レンジは0.5~67mg/dlで検量線のPrecision Profileは2mg/dl以上で2~5%と非常に安定であった。また、2~40mg/dlの検体について測定内、測定間変動を調べたところ2.4~8.5%と良好な再現性を示した。

2) 日月齢別CP値の変化

出生後から1歳までのCP値の経時変化を調べた(図1)。CP値は出生直後は低値であるが、経時的に増大し、生後5日目でCPの平均値は13.5mg/dl、1ヶ月で17.5mg/dlとなり、生後6ヶ月でほぼ一定値となった。

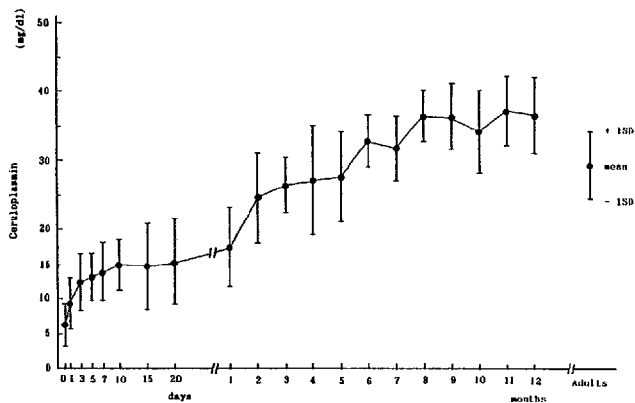


図1 採血時期によるセルプラスミン値の変化

3) 新生児, 1ヶ月児, ウイルソン患児のCP値の分布

新生児4~7日での分布は8,351例で13.5 \pm 3.8mg/dl, 1ヶ月児では17.5 \pm 5.7mg/dl, 患児15例では3.1 \pm 4.4mg/dlであった。15例の内13例は5.0mg/dl以下の値を示し、新生児の分布より低値であった(図2)。

4) 患児のCP値の各種測定法による比較

治療前の患児3例, 治療中の患児12例の濾紙血, 血清の測定値を比較した(表1)。CPのELISA法では濾紙血, 血清とも同等な測定値, 相関を示した。治療前の1例, 治療中の1例で10~15mg/dlの値を示し, 2例は3~5mg/dl, 11例は2mg/dl以下であった。SRID法は測定限界が5mg/dlであり, 低値まで注意して計測するとELISA法で低値例は1mg/dlと概算できるが, ネフェロメトリーでは5~6mg/dlとなり, 必ずしも低値を示さなかった。PPDオキシダーゼ法ではややばらつきは認められるがELISA法と同等の値を示した。

【考察】

ウイルソン病のマススクリーニング時期

として、発症時期や出生後のCP値の変化等から新生児期の検査は難しく、生後3ヶ月以降の時期が適当と考えられている。現在新生児マススクリーニングとして生後5日目に採血されるシステムがあり、この時期での検査が可能かどうか検討した。

患児15例のCP値の分布では、2例は10~15mg/dlと中間型の値を示し、新生児の正常範囲内を示すが、11例は2mg/dl以下、2例は3~5mg/dlと低値であった。こ

の値を新生児の分布に当てはめると、カットオフ値が5mg/dl(mean-2.2SD)では再検率は0.35%，4mg/dl(mean-2.5SD)では再検率は0.06%となり検出率はそれぞれ87%，80%となった。

ウイルソン病でCPが5mg/dl以下の割合は青木ら、Gibbsら、Schenbergらでは52~64%され²⁾、我々の開

発したELISA法では低値の割合が高率で、偽陽性率も0.35%と低値であった。

CPを低濃度域まで再現性よく測定できるELISA法では、ウイルソン病のうちCPが低値を示す約80%は新生児期でもスクリーニングが可能と思われた。

【文献】

- 1) Abe et al: Clin. Chem., 35, 552, 1989
- 2) 青木 継 他: 小児科, 30, 369, 1989

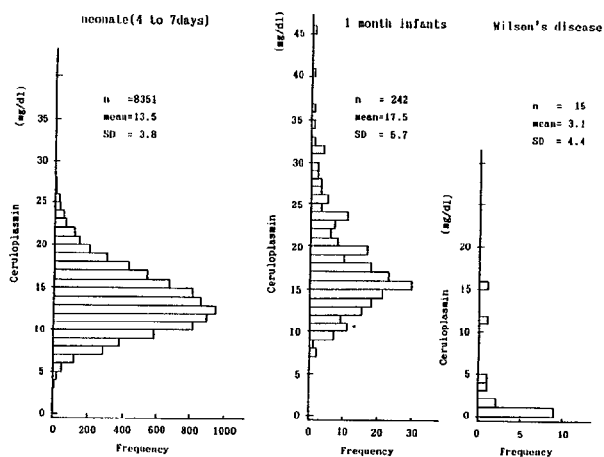


図2 新生児、1ヶ月児および患児のセルロプラスミン値の分布

表1 ウイルソン病患児の測定結果

No	濾紙血 CP			血清 CP			血清銅
	ELISA (mg/dl)	ELISA (mg/dl)	SRID (mg/dl)	Nephelometric (mg/dl)	Ferro-Oxidase (mg/dl)	FPD-Oxidase (μg/dl)	
治療済患児							
1 保〇〇母 F	11.9	14.3	14	13	18.8	13.7	104
2 奥〇〇母 M	1.92	-	-	5	-	-	-
3 保〇〇母 M	0.87	-	-	-	-	-	-
治療中患児							
4 保〇〇母 F	15.2	13.7	14	10	13.7	13.2	58
5 奥〇〇母 M	-	4.74	5	8	3.6	3.7	20
6 中〇〇母 F	3.26	3.62	4	6	2.2	1.0	17
7 川〇〇母 F	0.85	0.94	1 (<5)	6	3.1	1.4	10
8 川〇〇母 F	0.97	0.95	1 (<5)	6	3.0	1.3	3
9 保〇〇母 M	0.80	1.46	1 (<5)	5	3.0	1.9	10
10 保〇〇母 F	0.88	0.93	1 (<5)	6	2.7	0	12
11 保〇〇母 M	0.93	1.18	1 (<5)	6	1.8	1.1	12
12 米〇〇母 F	0.87	1.20	1 (<5)	6	1.7	0	10
13 小〇〇母 F	0.54	0.70	1 (<5)	6	5.0	0.5	10
14 保〇〇母 F	1.91	1.71	1 (<5)	6	2.3	0	16
15 月〇〇母 F	0.70	-	-	6	-	-	-
患児家族							
1 保〇 妹	18.7	18.8	20	20	21.5	17.7	72
1 保〇 父	13.9	15.4	15	17	18.4	16.5	66
1 保〇 母	12.7	12.9	13	14	13.9	13.7	48
成人対照 (n=45)	29.0±6.2 (17.9-48.3)	28.8±4.8 (17.9-43.6)	25.7±6.3 (17-44)		33.7±6.8 (20.7-56.0)	32.9±6.6 (18.1-50.7)	102±19 (66-172)

SRID : ヘキスト社 キット
 Nephelometric : ヘキスト社 キット
 Ferro-Oxidase : 協和メディック社 キット
 DIBr-PAESA法 : Abe et al. Clin. Chem. (1989)



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: ウィルソン病を早期に発見するためのスクリーニング法として、濾紙血液を用いるセルロプラスミンの ELISA 法を開発した。本法は低濃度域まで再現性良く測定できた。従来の報告と同様にセルロプラスミンは新生児期から経時的に増大し、生後 5 日目で平均値は 13.5 mg/dl で生後 6 ヶ月頃で一定となった。ウィルソン病の患児 15 例のセルロプラスミン値は 11 例が 2 mg/dl 以下、2 例が 3~5 mg/dl、2 例が 10~15 mg/dl であった。この値を新生児の分布に当てはめると、患児の 80%以上が低値となり新生児期でも発見できる可能性があった。