

## マススクリーニングの対象疾患検討に関する研究

分担研究者： 青木 継稔<sup>1</sup>

研究協力者： 荒島真一郎<sup>2</sup> 高田 五郎<sup>3</sup> 多田 啓也<sup>4</sup>  
成澤 邦明<sup>5</sup> 北川 照男<sup>6</sup> 鈴木 義之<sup>7</sup>  
小林 正紀<sup>8</sup> 折居 忠夫<sup>9</sup> 岡田伸太郎<sup>10</sup>  
一色 玄<sup>11</sup> 須藤 正克<sup>12</sup> 伊藤 道徳<sup>13</sup>  
遠藤 文夫<sup>14</sup> 松井 陽<sup>15</sup> 島田 司己<sup>16</sup>

**要旨：** 現行のマススクリーニングに加えるべき新しい対象疾患として、ウィルソン病マススクリーニングの多施設における検討を実施した。今年度は、ホロセルロプラスミンあるいはパラフェニレンジアミンオキシターゼ活性部分を認識する新しいモノクローナル抗体が開発され、低セルロプラスミン血を指標としたウィルソン病スクリーニングの感度・精度が上昇することが示唆された。これらのモノクローナル抗体を用いたElisa法によって各施設の間での検討において本症がスクリーニングされ得ることが確認された。ただし、問題点として、6カ月～5歳の間における採血の困難性、検査に対する説明と同意、セルロプラスミンの不安定性等が指摘され、今後解決すべき新たな問題となった。また、新しいモノクローナル抗体の作製の成功により、新生児血液濾紙による検査の見直し案も提案された。さらに、胆道閉鎖症やムコ多糖類症のスクリーニング法の検討、乾燥濾紙を用いた遺伝子増幅とElisa法を組み合わせた中鎖アシルCoA脱水素酵欠損症等の遺伝子診断法、GM<sub>1</sub>ガングリオシドホスフォリダーゼ遺伝子のスクリーニング法等が検討された。

**見出し語：** ウィルソン病のマススクリーニング、セルロプラスミンの新しいモノクローナル抗体、遺伝子診断、胆道閉鎖症スクリーニング等

- 
- |                    |                  |
|--------------------|------------------|
| 1. 東邦大学医学部第2小児科    | 9. 岐阜大学医学部小児科    |
| 2. 北海道大学医学部小児科     | 10. 大阪大学医学部小児科   |
| 3. 秋田大学医学部小児科      | 11. 大阪市立大学医学部小児科 |
| 4. 東北大学医学部小児科      | 12. 福井医科大学小児科    |
| 5. 東北大学医学部病態代謝学    | 13. 徳島大学医学部小児科   |
| 6. 日本大学医学部駿河台病院小児科 | 14. 熊本大学医学部小児科   |
| 7. 東京都臨床総合研究所      | 15. 自治医科大学小児科    |
| 8. 名古屋市立大学医学部小児科   | 16. 滋賀医科大学小児科    |

**研究目的：** 本研究は、現行のマススクリーニング対象疾患に加えるべき新しい疾患を選択し、その方法や実施時期等を検討するのが目的である。マススクリーニング対象疾患の条件は、①効果的な治療があること、②早期発見あるいは症状発現前の発見と早期治療による障害の発現や発症予防が可能であること、③マススクリーニング方法が開発されていること、④発症頻度が稀であるが、ある程度あること、⑤放置すると不幸な転帰をとるか重篤な後障害を残す疾患であること、などであり、わが国において実施されているマススクリーニングは、ほぼ上記の条件を満足するものであろう。さらに、費用便益についても今後の検討課題となろう。

本年度は、ウィルソン病のマススクリーニングを中心として新しい対象疾患について検討した。ウィルソン病については、上記マススクリーニングの条件を満たしていることやWHOのマススクリーニング疾患としての勧告がなされていること等により、従来から研究が進められてきた。今年度は、わが国の多施設において、ウィルソン病マススクリーニングの検討をお願いした。その結果を踏まえて、次年度の実施計画を検討した。また、中鎖アシルCoAを中心とした乾燥濾紙を用いた遺伝子増幅法をElisa法の組み合わせによる点変異の遺伝子診断法、GM<sub>1</sub>ガングリオシドーシス遺伝子のスクリーニング法、Duchenne型およびBecker型筋ジストロフィー症の保因者および出生前診断、フルクトースー1,6-ジフォスファターゼ欠損症の尿中糖リン酸分析によるスクリーニング法などの開発研究がなされた。さらに、近年、骨髄移植療法が有効とされるムコ多糖類症の1,9-ジメチルメチレンブルーを用いた尿によるスクリーニング法、

および1カ月児の便色調カラー写真による胆道閉鎖症のスクリーニング法についての検討が行われた。以下各研究協力者の研究成果の要約を記載する。

## 研究結果：

### I. ウィルソン病マス・スクリーニングに関する研究

#### 1. 抗セルロプラスミンモノクローナル抗体についての研究

ウィルソン病においては、アポセルロプラスミンからホロセルロプラスミンへの変換に障害があるとされ、ホロセルロプラスミン量を測定するためのモノクローナル抗体の開発が望まれていた。

今回、熊本大学小児科グループはホロセルロプラスミンのみを認識するモノクローナル抗体を作製し、ホロセルロプラスミン測定用キットを開発し、マススクリーニングへの応用について検討した。1歳6カ月児380検体（微量採血毛細管）およびウィルソン病5例の試料を測定し、ウィルソン病マススクリーニングに十分利用可能であると結論した（遠藤、松田ら）。

一方、東邦大学グループは、セルロプラスミンのパラフェニレンジアミン（PPD）オキシダーゼ活性部分を認識するモノクローナル抗体を作製し、さらに、セルロプラスミン蛋白部分を認識するモノクローナル抗体を作製し、二抗体を用いたElisa法を開発した（冷牟田、青木ら）。

#### 2. ウィルソン病マススクリーニング実施の検討

東邦大学グループは、1～6歳の小児102名およびウィルソン病患者8例について、上記二抗体Elisa法にて検討し、コントロール群は、23～30 mg/dℓ の範囲内、ウィルソン病患者平均1.8 mg/dℓ（1例のみ9 mg/dℓを示し、ほ

とんど $1.0\text{mg/dl}$ 以下)であり、上記二抗体 Elisa法の有用性を証明した(藤岡、森田、冷牟田、青木ら)。

東北大学グループは、小児400名の濾紙血を用いた Elisa法によるセルロプラスミン測定を用い、さらに4名のウィルソン病患者との比較検討を行い十分にスクリーニングできる結果を得たが、濾紙血の乾燥不十分な場合に、セルロプラスミン値が低下することを報告した。さらに、熊本大学方式の毛細管血と濾紙血のセルロプラスミン測定は高い相関があったとした(多田、大浦ら)。

徳島大学グループは、6カ月～3歳の小児を対象に熊本大学方式と二抗体 Elisa法を比較し良好な相関を得た。セルロプラスミンの不安定性と保存条件に対する検討の必要性および検査に対する同意の困難さが指摘された(伊藤、内藤、横田、黒田ら)。

日本大学グループは、北川らの開発した方法と二抗体 Elisa法について、小児77例の血清を用いて比較検討した。両法は、感度に差はあったが高い相関があり、いずれの方法もウィルソン病のスクリーニングに有用であり、本症のスクリーニングは可能と判断した。しかし、セルロプラスミンの部分活性を示す症例の存在があり、今後 Cut off値を含めて、さらに検討を加える必要があるとした(北川、大和田、鈴木ら)。

秋田大学グループは、6カ月～5歳までの小児について約100名の採血を実施し、熊本大学方式および二抗体 Elisa法を比較検討した。両方の有用性を証明したが、乳幼児健診の場における採血上の困難性について指摘された。とくに、採血するための人員確保が極めて難しい点、さらに、秋田県における1歳6カ月児および3歳児健診の受診率の低さが問題点として挙

げられた(石田、高田)。

その他、大阪市立大学および名古屋市立大学グループにおいても、6カ月～3歳児小児例の熊本方式および二抗体 Elisa法によるセルロプラスミン測定の検討が行われた。また、乳幼児健診における採血上の問題点が示唆された(大阪市大・一色、名古屋市大・小林ら)。

### 3. 尿中銅排泄から見たウィルソン病スクリーニングに関する検討

小児約200名の1回尿を除銅容器に採集し、ICP-Mass Spectrometerにて、尿中銅( $\mu\text{g}$ )を測定し、尿中銅( $\mu\text{g}$ )/尿中クレアチニン( $\text{mg}$ )比を求めた。0-2歳の間の乳幼児尿の値は、0.2以上を示すものもあり、3歳以降においては、すべて0.2以下を示した。したがって、2歳以下では、尿中銅/尿中クレアチニン比にて、尿中銅排泄を判断することは難かしいと判断されたが、3歳以降は比較的安定した値を示したため、本法を用いてウィルソン病をスクリーニングすることは可能と考えられた。3歳児ウィルソン病3例の尿中銅/クレアチニン比は、0.20以上であり、対照群はすべて0.17以下であった。症例数を増加させて検討する必要があるが、現状においては、0.17～0.20の範囲内に Cut off値を設定するとよいと考えた(川越、青木ら)。

### 4. 家族性低セルロプラスミン血症例

ウィルソン病のマスクリーニングに、低セルロプラスミン血を指標とした場合、血中セルロプラスミン値が中間値( $10-20\text{mg/dl}$ )を呈するものや3-5%のウィルソン病は、セルロプラスミン値が正常を示す例がある。一方、ウィルソン病ではないが、低セルロプラスミン血を示す家族性低セルロプラスミン血症の家系が報告されており、北海道大学グループは、今後ウィルソン病マスクリーニングにおいてセル

ロプラスミン測定により、ウィルソン病でない家族性低セルロプラスミン血症の報告が増加することを示唆した(高橋、荒島ら)。

## 5. ウィルソン病マススクリーニングに関する基礎的諸問題について

平成4年度に組織されたウィルソン病マススクリーニングに関する研究協力者会議を開催し、基礎的諸問題について討議した。採血法、採血時期、採血者、毛細管法・濾紙法、検体搬送、セルロプラスミン測定法、血清あるいは濾紙血のセルロプラスミン安定性に対する問題、セルロプラスミンCut off値の問題、採血に関する説明と同意、セルロプラスミン値が中間値や正常値を示すウィルソン病患者(3-5%)の存在、低セルロプラスミン血を示す保因者や家族性低セルロプラスミン血症例の存在、検査陽性者の取り扱い等について検討した(青木ら、島田ら)。

## II. マススクリーニングの新しい対象疾患に関する研究

### 1. マススクリーニングのためのElisa法を用いた簡易遺伝子診断法

乾燥濾紙血を用いて、遺伝子増幅法とElisa法による定色反応を組み合わせた簡便迅速な点変異の遺伝子診断法を考案し、本法は、原理的にすべての点変異の検出に用いることが可能であることと、またマイクロタイタープレートの使用と自動化による大量の検体処理の可能性があるとした(松原、成澤)。

### 2. GM<sub>1</sub> ガングリオシドシス遺伝子のスクリーニング法の開発

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損による疾患として、GM<sub>1</sub> ガングリオシドシスとモルキオ病がある。これらの疾患は発病時期によって乳児型、幼児型、成人型あるいはA・B型等に分類され、幼児型、成人型およびモルキオB病では、変異B

・A・Fを認めて酵素の残存活性を有する。本研究は、成人型日本人に共通にみられるA変異(I51T)に着目し、患者の $\beta$ -ガラクトシダーゼDNAのmutation Aを含む部分をPCR増幅し、制限酵素解析の実施を行った。本法は、病型診断、患者ならびに保因者の早期発見に有用であると考えられた(大島、桜庭、鈴木)。

### 3. DNA多型を用いたDuchenne型およびBecker型筋ジストロフィーの保因者診断と出生前診断について

pERT 87座のPCR-RFLPs分析とジストロフィン遺伝子両端のCAリピート部位のRFLPs分析を組み合わせることにより、保因者診断および出生前診断を実施した。Duchenne型筋ジストロフィー4家系、Becker型筋ジストロフィー1家系の中5例の出生前診断は、2例正常男胎児、1例Duchenne型筋ジストロフィー症胎児、1例非保因者胎児、1例判定不能という成績であった。さらに、SSCPを用いたRFLPs分析により、Duchenne型筋ジストロフィー症遺伝子欠失例(exon 48-54欠失)の母親を非保因者と診断した。本法は、遺伝子欠失家系の保因者診断に試みるべき方法と考えた(岡田、乾、福島、塚本)。

### 4. フルクトースー1,6-ジフォスファターゼ欠損症の尿中糖リン酸分析

フルクトースー1,6-ジフォスファターゼ欠損症において、糖リン酸を効率的に抽出し、HPLC法による分離操作を追加し、イオン交換樹脂抽出有機酸分画の糖リン酸を従来法とともに実施すれば、精度良く分析可能であり、ハイスクループの迅速なスクリーニングに利用できる可能性を示唆した(須藤、重松、中井)。

### 5. 1,9-Dimethylmethylene Blueを用いた $\alpha$ ムコ多糖類症スクリーニング法の検討

$\alpha$ ムコ多糖類症は、出生26,000人に1人以上の

頻度といわれ、骨髄移植による治療法が可能となっており、症状発現前の早期診断の必要性が要望されている。欧米において、1,9-ジメチルメチレンブルー（DMB）を用いた新生児マススクリーニング法が尿において検討され、岐阜大グループも実施をしてきた。その結果、尿は10 $\mu$ lの微量でよく、スクリーニング時期は4カ月頃が適当と考えられた。6カ月児345名のCut off pointを605 mg/g、クレアチニンとすると15例（4.9%）が疑陽性となったが、採尿指導により疑陽性率2%前後にできた。近く、パイロットスタディーを開始する予定である（折居）。

#### 6. 胆道閉鎖症の新生児マススクリーニングに関する検討

栃木県において、乾燥濾紙血中の総胆汁酸を測定することにより胆道閉鎖症の新生児マススクリーニングを実施したが、検査感度が低く、見逃がし例もあり、本法の実施について不可能と結論された。代替薬として、母子手帳に正常および淡黄色便の色調をカラー印刷して添付し、その番号を報告する方法を提唱した。本法により、母親、1カ月健診担当医や助産婦等の持続的教育を行い、胆道閉鎖症の早期発見率をあげることが望ましいと考えた（松井、入野）。

#### 考察および結論：

ウィルソン病は、銅キレート剤であるD-ペニシラミンや塩酸トリエンチン治療により発症予防が可能である。本症の診断は、临床上困難な面が多く、かなり症状が進行してから確定診断される例や小児期に劇症肝炎様の肝不全にて急激に不幸な転帰をとる例も比較的認められ、治療可能な疾患といわれながらもその遠隔成績は満足すべきものではない。したがって、本症は発症前に早期発見するためにマススクリーニ

ングすることが大切である。WHOにおいても、本症はマススクリーニングされるべき重要な疾患の一つとして取り上げられている。

本症のマススクリーニング法は、①低セルロプラスミン血を指標として検査する方法が一般的とされている。セルロプラスミンには、銅の結合していないアポ型と、銅結合型のホロ型の2種類があるが、従来の抗セルロプラスミン抗体はポリクローナル抗体であったため、両者を測定していた。ウィルソン病は、ホロ型セルロプラスミンの生成が悪いとされ、ホロ型セルロプラスミンに対するモノクローナル抗体の開発が望まれていた。今回、熊本大学グループおよび東邦大学のグループ2箇所より、ほぼ同様なホロ型セルロプラスミンを測定できるモノクローナル抗体が作製された。血中のホロ型セルロプラスミンが測定されることにより、ウィルソン病の著しい低セルロプラスミン血の存在が各研究協力者によって確認され、従来のポリクローナル抗体による測定より、さらに感度・鋭敏度（精度）の上昇が期待できることになった。一方、血清あるいは濾紙血中のセルロプラスミンの不安定性、標準セルロプラスミンの不安定性が指摘され、また、採血時期を今回6カ月～5歳の間に設定したが、採血者確保の問題や採血に関する説明と同意の困難性が改めて指摘された。さらに、ホロ型セルロプラスミンに対するモノクローナル抗体の出現により、新生児血液濾紙による低セルロプラスミン血指標の検査を再検討する意見が出された。

ウィルソン病のマススクリーニング法のもう1つの方法として、②尿中銅を測定してスクリーニングする方法がある。今回、1回尿による尿中銅/尿中クレアチニン比による測定法が示され、今後さらに症例を増やして検討することとなった。

次年度は、ウィルソン病マススクリーニングに関して1歳6カ月～5歳児を中心に血液濾紙および毛細管法による低セルロプラスミン血を指標としたスクリーニングを多施設において多くの例(目標として10,000例以上)で実施すること、また、新生児血液濾紙を用いて出来る限り多くの例により新しいモノクローナル抗体を

用いて実施すること、さらに、尿を使用した1回尿の尿中銅/尿中クレアチニン比の検討を進めることとした。

マススクリーニング対象疾患としての新しいものへの開発については、スクリーニングに関する考え方を含めて新しい疾患の模索、遺伝子診断や保因者診断等についても検討する。



## 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



要旨:現行のマスクリーニングに加えるべき新しい対象疾患として、ウィルソン病マ  
スクリーニングの多施設における検討を実施した。今年度は、ホロセルロプラスミンある  
いはパラフュニレンジアミンオキシターゼ活性部分を認識する新しいモノクローナル抗体  
が開発され、低セルロプラスミン血を指標としたウィルソン病スクリーニングの感度・精  
度が上昇することが示唆された。これらのモノクローナル抗体を用いたElisa法によって  
各施設の間での検討において本症がスクリーニングされ得ることが確認された。たゞし、  
問題点として、6 ヶ月~5 歳の間における採血の困難性、検査に対する説明と同意、セル  
ロプラスミンの不安定性等が指摘され、今後解決すべき新たな問題となった。また、新し  
いモノクローナル抗体の作製の成功により、新生児血液濾紙による検査の見直し案も提案  
された。さらに、胆道閉鎖症やムコ多糖類症のスクリーニング法の検討、乾燥濾紙を用い  
た遺伝子増幅とElisa法を組み合わせた中鎖アシル CoA 脱水素酵欠損症等の遺伝子診断法、  
GM1 ガングリオシドーシス遺伝子のスクリーニング法等が検討された。