

ウイルソン病のマススクリーニング：
ホロセルロプラスミンに対するモノクローン抗体を用いたホロセルロ
プラスミン測定法の開発とそのマススクリーニングへの応用

(分担研究:マス・スクリーニング対象疾患に関する研究)

遠藤文夫, 中村公俊, 栗田久多佳, 松田一郎

要約:ウイルソン病では血中のホロセルロプラスミンが低値になるのが特徴的である。この特徴は疾患の診断にも応用されている。そこで我々はウイルソン病のマススクリーニングを目的として、ホロセルロプラスミンだけを認識する抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体を用いた酵素抗体法を開発した。検査試料としては毛細管血又は濾紙血を使用する。採血から測定キットまでを一括して開発し、実際に使用してみたところ患者と正常を容易に区別することが出来た。基本的には毛細管血、濾紙血の双方を用いて、ウイルソン病のマススクリーニングは可能と考えられた。今回の研究結果から我々が開発したモノクローン抗体を用いたELISA法(酵素抗体法)はウイルソン病のマススクリーニングに応用可能であることが明らかになった。今後は(1)試料の選択(2)採血時期の問題について検討する必要がある。

見出し語:ウイルソン病、マススクリーニング、セルロプラスミン、モノクローン抗体

【目的】ウイルソン病のマススクリーニングの実施をめざして(1)ホロセルロプラスミンの簡易測定法(ELISA)の開発(2)毛細管血(1才6ヵ月児)を用いたホロセルロプラスミンの測定(3)濾紙血(1才6ヵ月児)を用いたホロセルロプラスミンの測定を行ない、この方法がマススクリーニングに適しているか検討した。

【方法】

(1)ホロセルロプラスミン測定法の開発

まずセルロプラスミンに対するモノクローン抗体を作成しその特性について検討した。モノクローン抗体は精製ヒトセルロプラスミンでマウスを免疫して作成した。抗体は腹水から回収し精製して用いた。次にこのモノクローン抗体を利用した酵素抗体法によるセルロプラスミンの測定方法を開発した。第1抗

体としては抗ヒトセルロプラスミン山羊IgGを用いた。第2抗体はペルオキシダーゼ標識抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体を用いた。ホロセルロプラスミン測定用標準物質はセルロプラスミンフリー血清に既知の濃度のホロセルロプラスミンを加えて作成した。

(2) 1才6ヶ月児を対象としたホロセルロプラスミンの測定

1才6ヶ月の集団を対象に採血を行ない、今回開発した酵素抗体法を応用しマススクリーニングが行なえるかどうか検討した。採血方法としては毛細管血を採取する方法と濾紙血を用いる方法を比較した。また遠隔地からの検体の輸送の影響についても検討した。

【結果】

(1) モノクローン抗体の特性とそれを利用した酵素抗体法

この抗体にアポセルロプラスミンとホロセルロプラスミンを混合して反応させると、ホロセルロプラスミンとだけ反応した(図1)。従ってこの抗体を用いた酵素抗体法はホロセルロプラスミンだけを測定する目的に使用できるものと考えられた。この方法でウイルソン病患者血中のセルロプラスミンを測定するとほぼ検出限界に近い値(0に近い値)が得られた(図2)。

(2) 濾紙採血と毛細管希釈法の比較

毛細管で採血しただちに希釈して検査センターに送付しセルロプラスミンを測定する方法ではセルロプラスミンの安定性が優れていた。一方、濾紙を用いる採血測定系ではセルロプラスミンが比較的不安定であった。毛細管血を用いた場合の結果と濾紙血を用いた結果を図3、4に示した。しかし濾紙を用いる

方法でも試料の取り扱いを注意深く行なうことでマススクリーニングへの応用は可能であると思われた。

【考察】

今回開発した酵素抗体法ではホロセルロプラスミンをアポセルロプラスミンと区別して測定することが出来た。ウイルソン氏病では血中のホロセルロプラスミンが著明に減少しアポセルロプラスミンは正常者と同等に存在すると言われている。そこで今回開発した方法はウイルソン病の診断には有用と考えられた。そこでこの方法を用いてウイルソン病患者の血清と正常者の血清を用いて血中セルロプラスミンを測定してみたところウイルソン病患者ではホロセルロプラスミン値はほぼ0に近く正常者と容易に区別出来た。これまではホロセルロプラスミンの測定はその酵素活性を測定することで可能であったが、今回開発した方法によると微量の血液を全血のまま用いてホロセルロプラスミンを測定することが可能になった。これらの結果から今回開発した方法は基本的にはマススクリーニングに応用できるものと考えられた。そこで実際に小児を対象に採血を行ない、この方法のスクリーニング法としての有用性について検討してみた。採血法としては従来からマススクリーニングに利用されている濾紙採血法と年長児の採血に有用とされている毛細管を用いる方法を比較、検討してみた。その結果いずれの方法でもホロセルロプラスミンの測定は可能であり、しかも正常者とウイルソン病患者を区別することは容易であった。ただし、濾紙を用いた場合、採血後の時間の経過とともにセルロプラスミンが不安定になり測

定値が低値を示した。濾紙を用いた場合のセルロプラスミンの不安定性についてはさらに検討を要すると思われた。

この方法はこれまでのセルロプラスミン測定法と比較していくつかの点で優れている。その第1にウイルソン氏病患者と正常者を容易に区別できる点である。第2に毛細管血または濾紙血をそのまま酵素抗本法に用いるの点である。これらの点はマススクリーニングの応用に十分たえると思われる。

今後の課題として

- (1) 年少のウイルソン病患者の血液を用いて検査を行なう。
- (2) 多数の検体に応用してさらに問題点を明らかにしていく。

ことがあげられる。さらに未発見の年少患者の発見が可能かどうかは大規模なプロスペクティブな検討を行なう必要がある。

今回は他の施設の研究者にもこの方法に基づいたキットを送付し検討していただいた。これらの施設名は秋田大学小児科(高田五郎教授)、東北大学小児科(多田啓也教授)、名古屋市立大学小児科(小林正紀先生)、徳島大学小児科(伊藤道徳先生)、日本大学駿河台病院小児科(北川照男教授)、滋賀医科大学小児科(島田司巳教授)である。これらの施設のなかで一部の施設では同一の検体を我々の施設と同時に検査し検討してみた。その結果採血と輸送に関しては順調にすすんだものと考えている。また測定についても基本的には成功している。この方法でのマススクリーニングを行なうに際して、他施設との共同の検討を行なうことは重要であろうと考えている。今後さらに共同研究を進め、この方法でのウイルソン氏病のマススクリーニングを実施し

たい。

謝辞：この研究に御協力いただいた化血研(熊本市)および化血研武田堅吾氏に深謝致します。

【文 献】

(1) 遠藤文夫 松田一郎

平成3年度厚生省心身障害研究「小児慢性疾患のトータルケアに関する研究」
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ELISA法について

平成3年度報告書 223-224頁

図1 モノクローン抗体を用いた酵素抗体法におけるアポセルロプラスミン添加の影響

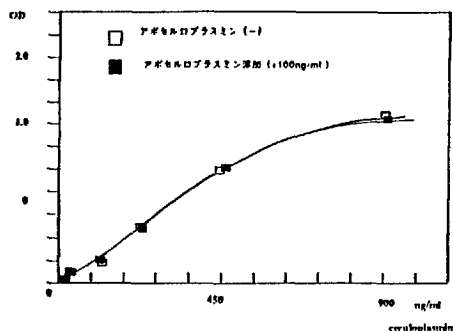


図1 ホロセルロプラスミンにアポセルロプラスミンを添加した場合の測定値の変化

図2 正常者とウイルソン氏病患者の血中セルロプラスミン値 (毛細管血法で測定)

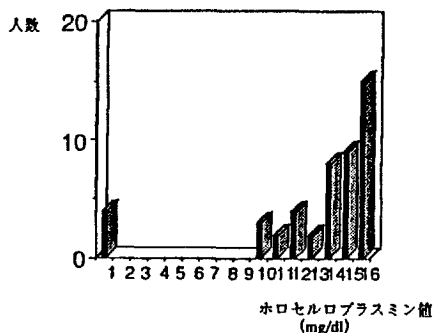


図2 ウイルソン氏病患者血中ホロセルロプラスミン値と正常者測定値下限

図3 1才6か月児のホロセルロプラスミン値の分布 (毛細管血法による)

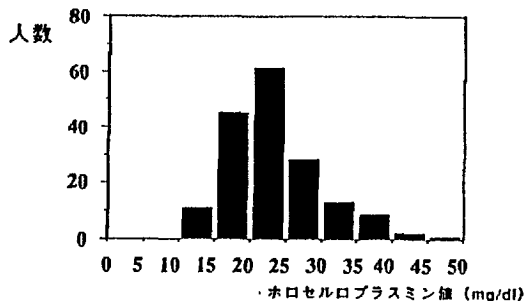


図3 毛細管血を用いたセルロプラスミン測定値の分布 (1才6ヶ月児と2才のWilson氏病患者を示す)

図4 ホロセルロプラスミン値の分布 (濾紙血法)

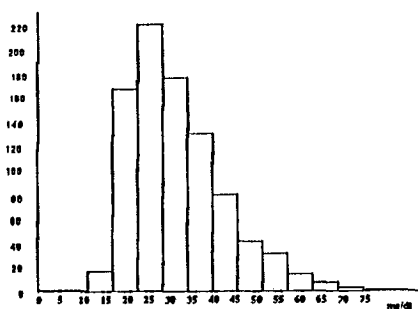


図4 濾紙血を用いたセルロプラスミン測定値の分布 (1才6ヶ月児のみを示す)



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:ウイルソン病では血中のホロセルロプラスミンが低値になるのが特徴的である。この特徴は疾患の診断にも応用されている。そこで我々はウイルソン病のマススクリーニングを目的として、ホロセルロプラスミンだけを認識する抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体を用いた酵素抗体法を開発した。検査試料としては毛細管血又は濾紙血を使用する。採血から側定キットまでを一括して開発し、実際に使用してみたところ患者と正常を容易に区別することが出来た。基本的には毛細管血、濾紙血の双方を用いて、ウイルソン病のマススクリーニングは可能と考えられた。今回の研究結果から我々が開発したモノクローン抗体を用いたELISA法(酵素抗体法)はウイルソン病のマススクリーニングに応用可能であることが明らかになった。今後は(1)試料の選択(2)採血時期の問題について検討する必要がある。