

新しい抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いた
Wilson病のスクリーニング
(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患検討に関する研究)

藤岡芳実*、青木維穂*、青木 豊**、森田嘉一**、
大塚昌信**、癸生川貴子**、冷牟田修一***、清水敬子***

要約：新しい抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたELISA法により、Wilson病のスクリーニング法を検討した。本方法により、Wilson病患者の血清セルロプラスミン（以下、Cpと略す）値は、非Wilson病患者に比べて有意に低値を示した。本方法は、ホロ（活性型）Cpのみを測定できるため、比較的アポCpが血中に増加しているWilson病症例を検出できる利点が大いと考えられる。

見出し語：Wilson病マス・スクリーニング、血清セルロプラスミン、
PPD oxidase 活性部分認識抗セルロプラスミンモノクローナル抗体、

研究目的：先天性銅代謝異常の代表的疾患であるWilson病は、早期発見により治療あるいは予防可能であり、出生約3.5～4.5万人に一人という頻度からも、マス・スクリーニングの必要性が提唱されている。我々は、Wilson病患者の95%以上が低Cp血症を呈することより、血清Cp測定によるマス・スクリーニング法を研究してきた。今回は、共同研究者の冷牟田の作製したCpのパラフェニレンジアミン(PPD) oxidaseの活性部分を認識する新しい抗Cpモノクローナル抗体を用いたELISA

法により、低Cp血症を発見できるか否か、また、Cut off 値は従来より推定してきた15mg/dl でよいかどうかを検討した。

対象および方法：対象は、Wilson病患者8例（年齢5～44歳）と、コントロールとしてWilson病以外の入院および外来患者94例（1歳未満15名、1-3歳未満20名、3-6歳未満23名、6歳以上36名）である。採血して得られた血清は、-20℃以下に保存し、約50日以内に測定した。測定方法は、図1に示すサンドイッチELISA法である。1次抗体(ID1抗体)

* 東邦大学医学部第二小児科学教室、**東邦大学大橋病院臨床検査、*** 出光興産中央研究所

図 1

ELISA法による活性セルロプラスミンの測定

- (1) 1次抗体
ID1抗体を96wellプレートに固定
(10 μ g/ml, 100 μ l/well)
↓ 30 $^{\circ}$ C, 2hr or 4 $^{\circ}$ C, over night
- (2) 洗浄
0.05% Tween20-PBS, 3回
↓
- (3) ブロッキング
ブロックA (4倍希釈) (100 μ l/well)
↓ 30 $^{\circ}$ C, 2hr or 4 $^{\circ}$ C, over night
- (4) 洗浄
0.05% Tween20-PBS, 3回
↓
- (5) サンプル
患者血清 (1000倍、10000倍希釈) (100 μ l/well)
正常血清
標準セルロプラスミン (0, 10, 20, 30, 40, 50 ng/ml) (100 μ l/well)
↓ 30 $^{\circ}$ C, 1.5hr
- (6) 洗浄
0.05% Tween20-PBS, 3回
↓
- (7) 2次抗体
ペルオキシダーゼ標識-ID2抗体 (10 μ g/ml, 100 μ l/well)
↓ 30 $^{\circ}$ C, 1.5hr
- (8) 洗浄
0.05% Tween20-PBS, 3回
↓
- (9) 反応基質
オルトフェニレンジアミン 10mg (1錠)
クエン酸リン酸Buffer 25ml
H₂O₂ 5 μ l (100 μ l/well)
↓ 30 $^{\circ}$ C, 3min
- (10) 反応停止液
2M H₂SO₄ (20 μ l/well)
- (11) OD測定
波長 492nm

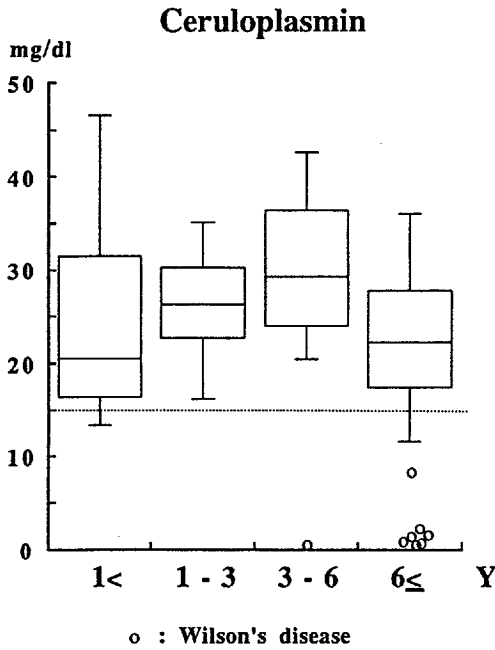
は、Cpの蛋白部分を認識し、2次抗体(ID2抗体)はペルオキシダーゼ標識を行い、CpのPPD oxidase 活性部位を認識する抗体である。この両者の抗体を用いることにより、測定されるCpは活性型のホロCpのみである。吸光度を測定し、標準Cp溶液を用いて作成した検量線から濃度を算出した。

結果：コントロール群の1歳未満(15例)の血清Cp値の平均は、23.9 \pm 2.5mg/dl、1歳以上3歳未満(20例)の平均は、26.3 \pm 1.2mg/dl、3歳以上6歳未満(23例)の平均は、

30.2 \pm 1.5mg/dl、6歳以上(36例)の平均は23.0 \pm 1.1mg/dlであった。Cp値15mg/dl未満は、全体の8.5%であり、1歳以上のコントロール群では6.3%であった。非Wilson病患者でCp 15mg/dl以下であったのは、ネフローゼ症候群、血管性紫斑病、てんかんおよび悪性腫瘍の化学療法中の児であった。Wilson病患者の平均Cp値は、1.8 \pm 1.1mg/dl(Wilson病患者中の75%は、1mg/dl以下)であった。

考察：新しく開発された抗ヒトCpモノクローナル抗体を用いたELISA法の利点は、従来の

図2



Cp測定法に比べ、酵素発現部位に特異的に結合するため、活性型のホロCpのみを測定できること、洗浄操作を繰り返すことにより溶血の影響を受けないこと、検体量が極微量で測定可能であることが挙げられる。特に、ホロCpを直接測定することにより、ホロ型Cpが合成されず血中において著しく低く、比較的アホCpが血中に増加しているといわれるWilson病症例を検出できる利点が大きいと考えられる。CpのCut off 値については、15mg

/dl 以下を示した例は、1歳未満および基礎疾患を持つ児が多かったため、15mg/dl 以上と推定されるが、今後例数を増やして、次年度は、地域の保健所や小児科医会の協力を得て、1歳6カ月および3歳児健診を利用してパイロットスタディを実施していく予定である。さらに、この新しく作製された抗Cpモノクローナル抗体は、ホロ型Cpを測定することが可能となってきたことより、新生児戸紙血を用いて低Cp血症のスクリーニングが可能かもしれない。従って、新生児戸紙血においても再検討する。

参考文献:

1. Saito T. An assessment of efficiency in potential screening for Wilson's disease. J Epidemiol Comm Health, 1981;35:274-280.
2. Report of a WHO Scientific Group. Screening for inborn errors of metabolism. WHO Technical Report Series, No. 401. Geneva, WHO Press, 1968.
3. 青木 継穂, 中橋 雅子. ろ紙血斑を用いたセルロプラスミン測定—Wilson病およびMenkes's kinky-hair 病の早期スクリーニングへの応用. 医学のあゆみ, 1978;12: 822-824.



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:新しい抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により、Wilson 病のスクリーニング法を検討した。本方法により、Wilson 病患者の血清セルロプラスミン(以下、Cp と略す)値は、非 Wilson 病患者に比べて有意に低値を示した。本方法は、ホロ(活性型)CP のみを測定できるため、比較的アポ CP が血中に増加している Wilson 病症例を検出できる利点大きいと考えられる。