

熊本地方におけるウイルソン病マススクリーニングの実施とその問題点  
(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\*、粟田久多佳\*、松田一郎\*  
武田賢吾\*\*

<要旨>

我々はこれまでの研究で、抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体(CP60)を開発し、これを利用した酵素抗体法によるホロセルロプラスミン測定系を開発してきた。この方法は正常人とウイルソン病患者を区別し、ウイルソン病患者を診断するのに優れた方法であることをこれまで示してきた。その一方で、濾紙血液を用いたマススクリーニングへの応用を実施するには、抽出、測定に至る手技を簡略化すること求められていた。昨年度の研究では、濾紙血検体を用いたホロセルロプラスミンの直接測定法を開発し、これによって血液濾紙片から測定用プレート上で直接セルロプラスミンを抽出することが可能になった。今回はこの方法を実際のスクリーニングに使用し、その問題点などについて明らかにした。新生児検体の測定を行ったところ、平均値9.06mg/dlの正規分布を示した。カットオフ値を平均値の-2SD以下に設定し、同一濾紙試料を用いた再検査の対象とした。その結果、すべての検体がカットオフ値の範囲にはいり、再採血を要した検体はなかった。患者における診断基準が不明確であることから、この値が適切であるかどうか今後の検討が必要である。

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

1. はじめに

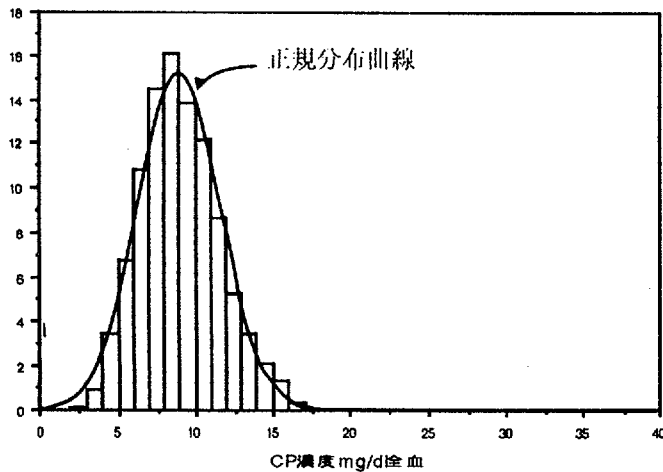
ウイルソン病は常染色体劣性の先天性銅代謝異常であり、治療にはD-ペニシラミンが有効である。これまでの臨床観察から、発症前診断と早期治療は本症の予後を大きく改善することが期待され、マススクリーニングの可能性が検討されている

(1)。我々は、抗ホロセルロプラスミンモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用いた酵素抗体法により血中ホロセルロプラスミンを測定系を

開発した。この測定系によりウイルソン病患者と対照者を容易に区別することができ、この系を用いたウイルソン病のマススクリーニングが可能であると考えられた。しかし、マススクリーニングに応用するには、とくに濾紙血からのセルロプラスミンの抽出と希釈が煩雑で時間と手間・費用を要する点が障害であった。我々は昨年度の研究においては、技術的にマススクリーニングへの応用可能な測定系を報告したが、本年はこの方法を

\*熊本大学医学部附属病院小児科      \*\*化学及血清療法研究所

図1 新生児全例におけるホロセルロプラスミン値のヒストグラム



用いて熊本地方におけるパイロットスタデーを行った。

## II. 方法

### 1. モノクローナル抗体と酵素抗体法の開発

モノクローナル抗体 (CP60) の作成はすでに報告した (2, 3)。酵素抗体法は、固相抗体としてモノクローナル抗体 (CP60) を用い、抗ヒトセルロプラスミンIgG (ヤギ) を標識抗体とした (2, 3)。標準物質には既知の濃度のセルロ

プラスミンにセルロプラスミンフリー血清を添加して用いた。希釈した血清試料と反応後に発色させ、吸光度を測定した。

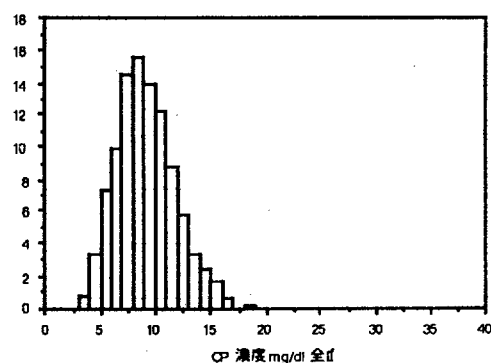
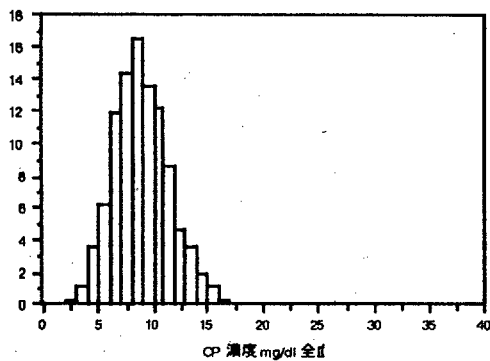
## III. 結果

検体は検査済み新生児濾紙血を用いた関係上、採血から、1-2週間経過したものであった。この間4°Cに保管しておいた。検体数は2000検体であった。ホロセルロプラスミン値は平均値9.03mg/dlで正規分布を示した。これらの検体中、測定値3mg/dl以下

の値をしめした検体は3検体であった。これらの検体を同一濾紙から再検査したところ、すべて3.8mg/dl以上の値 (平均値の-2SD以上) を示した (図1)。

図2には男女別のホロセルロプラスミン値をヒストグラムで示した。この結果から、新生児ホロセルロプラスミン値に性差は認められなかった。新生児の体重、在胎週数、採血日とホロセルロプラスミン値の関連について観察したところ、在胎

図2 新生児男女別のホロセルロプラスミン値のヒストグラム



週数4 1週以上の新生児では平均値よりも高い値を示すことが明らかになった。

また生下時体重1000-2000gの児ではホロセルロプラスミン値は平均値以下を示すことが多かった。これらの点は今後スクリーニングを進めていくうえでさらに検討を要するものと思われた。

#### IV. 考案

ホロセルロプラスミンの特異的測定法の開発は、ウイルソン病のマススクリーニングに新しい可能性をもたらすものと考え、これまで一連の研究を行ってきた。われわれは平成4年度の研究報告で述べたようにヒトホロセルロプラスミンを特異的に認識するモノクローン抗体を作製し、これを用いたホロセルロプラスミン測定法を開発した。この方法は培養肝細胞におけるヒトセルロプラスミンの生合成の検討においても、有用であることが示された(3)。この方法はすでに新生児と生後1歳6ヶ月児におけるホロセルロプラスミンの測定にも応用され、我々はスクリーニングへの応用の可能性を示している(2)。

また平成5年度に報告したように、さらに直接抽出法を開発したことによって、より簡便で、マススクリーニングに応用可能な検査方法を確立した。今回は熊本地方において新生児濾紙血を用いた検査を実施した。その結果、我々がカットオフ値として考えた平均値の-2SD以下の検体は3検体見いだされた。しかし、いずれの検体においても、同一濾紙血による再検査で基準値以上の値が得られた。したがって、これまでのところ、再採血を必要とした例はなかった。

今回の研究から基準値の設定が再度検討しなければならない問題として重要と思われた。上述のように、新生児におけるホロセルロプラスミン値は正規分布を取るため、患者と正常を区別する値は設定しにくい。またウイルソン病患者の新生児期におけるホロセルロプラスミン値が判明していない。そこで、実際的に再検査、再採血が要求さ

れる検体数から設定していくことが、一つの方法である。他の地方におけるマススクリーニングの経験などの結果を踏まえて、カットオフ値を再検討していきたい。

これらの検討をととしてウイルソン病のマススクリーニングの研究においては新生児期・乳児期でのホロセルロプラスミン値がウイルソン病の診断に有用であるかどうかを明らかにすることが重要である。そのためには大規模のコホート研究を組む必要があると思われるが、新生児期以降に採血の機会があれば、診断の確実性はさらに増すものと考えられる。

#### V. 参考文献

- (1) 青木継稔 他: Wilson病. 小児科診療 55(11): 2305-2312 (1992)
- (2) Endo, F. et al  
J.Inher.Metab.Dis.17: 616-620, 1994
- (3) Nakamura, K., Endo, F. et al.  
J.Biol.Chem. (in press)



## 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>

我々はこれまでの研究で、抗ホロセルロプラスミンモノクローン抗体(CP60)を開発し、これを利用した酵素抗体法によるホロセルロプラスミン測定系を開発してきた。この方法は正常人とウィルソン病患者を区別し、ウィルソン病患者を診断するのに優れた方法であることをこれまで示してきた。その一方で、濾紙血液を用いたマススクリーニングへの応用を実施するには、抽出、測定に至る手技を簡略化すること求められていた。昨年度の研究では、濾紙血検体を用いたホロセルロプラスミンの直接測定法を開発し、これによって血液濾紙片から測定用プレート上で直接セルロプラスミンを抽出することが可能になった。今回はこの方法を実際のスクリーニングに使用し、その問題点などについて明らかにした。新生児検体の測定を行ったところ、. 平均値 9、06mg/dl の正規分布を示した。カットオフ値を平均値の-2SD 以下に設定し、同一濾紙試料を用いた再検査の対象とした。その結果、すべての検体がカットオフ値の範囲にはいり、再採血を要した検体はなかった。患者における診断基準が不明確であることから、この値が適切であるかどうか今後の検討が必要である。