

## ウィルソン病の新生児マス・スクリーニングの検討

- 新生児マス・スクリーニングの実施と新生児期での確定診断の検討 -  
(分担研究： マス・スクリーニングの新しい対象疾患に関する研究)

荒島真一郎<sup>1</sup>, 山口昭弘<sup>2</sup>, 福士 勝<sup>2</sup>, 菊地由生子<sup>2</sup>

**要 約：** 新生児濾紙血セルロプラズミン(CP)のELISA測定によるウィルソン病の新生児マス・スクリーニングパイロットスタディを行った。1994年4月から12月までに札幌市内の医療機関からの総受付検体数13,861例の98%にあたる13,537例で本検査に対する保護者の同意が得られた。初回測定で仮のカットオフ値(CP:4-6mg/dl)を下回った検体は176例であり、同一検体による再測定の結果も低値を示した9例に再採血を依頼した。この内6例の再採血検査を行えたが、結果はいずれも正常であった。さらに確認検査法開発の基礎的検討としてウィルソン病患者10家系31例のリンパ球DNAを用いたマイクロサテライト多型/ハプロタイプ解析を行った。その結果、日本人ウィルソン病遺伝子に2種類の共通ハプロタイプ(いずれも4/12疾患染色体)が存在することがわかったが、これらのハプロタイプも含め、日本人ウィルソン病患者には欧米人の患者において報告されている遺伝子変異は認められなかった。今後、共通ハプロタイプの変異を明らかにすることにより、新生児期での確定診断への応用が可能になるものと期待される。

見出し語： ウィルソン病, マス・スクリーニング, ハプロタイプ解析

### 研究方法：

[濾紙血CP測定] 出光興産より供与されたCP測定用ELISA試薬を用いた<sup>1)</sup>。濾紙血抽出液の調整はマイクロプレート自動分注装置Mega Flex (Tecan)を用い、以下の操作に従った。丸底マイクロプレートにパンチした3mm経血液ディスク1枚にPBS-0.1%BSA溶液200 $\mu$ lを加え、4 $^{\circ}$ Cに一晩放置する。この溶出液20 $\mu$ lにPBS-0.1%BSA溶液200 $\mu$ lを加えた希釈液100 $\mu$ lをELISAに用いる。

[ハプロタイプ解析] ウィルソン病患者およびその家族(10家系31例)のリンパ球DNAを試料として、ウィルソン病遺伝子(ATP7B)の極めて近傍(数十Kb内)のマイクロサテライトマーカー3種<sup>2)</sup>をPCRにより増幅し、オートシーケンサーSQ-5500 (Hitachi)を用いて多型を検出した。

### 結 果：

[パイロットスクリーニング結果] 札幌市における1994年4月から12月の新生児マス・

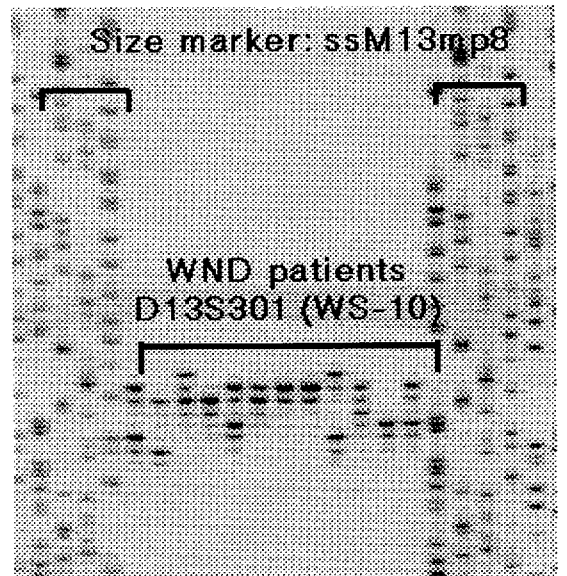
<sup>1</sup>北海道大学小児科, 北海道教育大学札幌校, <sup>2</sup>札幌市衛生研究所,

**Table Results of Pilot Study for Newborn Wilson Disease Screening in Sapporo City**  
 - from Apr. 1 to Dec. 28 '94 -

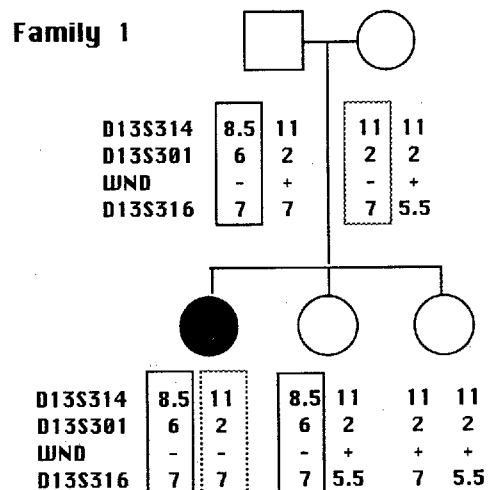
Received	Screened	Retested on the same card	Recall requested	Clinically evaluated
13,861	13,537 rejected* 324 (2.3%)	176 (1.3%)**	9 (0.07%) recalled 6 (0.04%)	0
* hospitals including rejected samples were 3/60 (5%).				
** temporary cut-off (CP: 4-6mg/dl-blood), 2 to 4 blood discs were used for the retest.				

スクリーニング検体総受付数は13,861例であり、この98%にあたる13,537例で本検査に対する保護者の同意が得られた。初回測定で仮のカットオフ値(CP:4-6mg/dl)を下回った検体は176例であり、同一検体による再測定の結果も低値を示した9例に再採血を依頼した。これらの要再採血とした検体の半数以上にあたる5例は2,500g未満、あるいは在胎36週以下の未熟児であった。この内6例の再採血検査を行えたが、結果はいずれも正常であった(Table)。なお、再採血を行えなかった3例はいずれも里帰り分娩のため連絡が取れなかったケースである。

[ウィルソン病家系のハプロタイプ解析]  
 マイクロサテライト多型の検出例をFig.1に示したが、いずれのマーカーとも高度な多型を示し、詳細なハプロタイピングが可能であった。Fig.2に示した家系解析の例では、患児のすぐ下の妹は、父親由来の疾患染色体と母親由来の正常染色体を有するヘテロ保因者であること、これに対し、その下の妹は両方とも正常染色体を有することがわかる。日本人ウィルソン病6家系において認められたハプロタイプを、それぞれの疾患および正常染色体と対比してFig.3にまとめて示した。疾患染色体には2種類の



**Fig. 1. Detection of polymorphism using a microsatellite marker**



**Fig. 2. Haplotype analysis for a Wilson disease family**

		Family 1		2		3		4		5		6	
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
WND chromosome	D13S314	8.5	11	11	7.5	11	11	11	11	11	11	6.5	10.5
	D13S301	6	2	3	1	3	3	3	2	2	2	2	4
	WND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D13S316	7	7	7	4	7	7	7	7	7	7	7	7
Normal chromosome	D13S314	11	11	9	7.5	11	10.5	11	7.5	11	8.5	8.5	7.5
	D13S301	2	2	2	5	-1	4	0	5	3	5	5	5
	WND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D13S316	7	5.5	10	4	4	7	7	4	4	7	5.5	7

Fig. 3. Comparison of Haplotyping between disease chromosomes and normal chromosomes from 6 families with Wilson disease

共通ハプロタイプ(11-2-7, 11-3-7)が存在し、これらのハプロタイプは正常染色体に比べ、明らかに疾患染色体への局在を示すことから、ウィルソン病遺伝子 $ATP7B$ の変異と密接に関連している可能性が示唆された。これらの共通ハプロタイプも含め日本人ウィルソン病患者11例について、欧米人患者に報告されている遺伝子変異2種類；Wc1/1950-6 deletion, pWD02/C2142 to Aを調べたが、全例いずれの変異も認められなかった。

#### 考 察：

新生児濾紙血CPのELISA測定が、ウィルソン病マス・スクリーニングの現時点では最も現実的な方法である。しかし、CP低値を示さない一部の患者に対する偽陰性は本質的に別問題としても、我々のパイロットスクリーニング結果でも、未熟児あるいは一過性の低CP血症が多数検出され、新生児期のCP値のみでは患者との鑑別が困難なことは明らかである。従ってマス・スクリーニング実施に際しては、より信頼性の高い

確認検査法の開発が必要とされている。

一方、ウィルソン病の原因遺伝子は1993年にクローニングされ、現在、欧米人を中心に病因遺伝子変異の候補がいくつか報告されてきており、特定の病因遺伝子変異が同定されれば、DNA診断が確認検査法として極めて有用な方法となることが期待される。今回、我々は、基礎的検討として、日本人ウィルソン病の遺伝子変異についての情報を得るため、ハプロタイプ解析を試みた訳であるが、6家系12本の疾患染色体の内、各4本ずつの共通ハプロタイプが存在することがわかった。これらのハプロタイプは、それぞれ共通の遺伝子変異を有する可能性が高く、現在、これらの遺伝子変異を同定するため、患者の $ATP7B$ のDNA塩基配列を解析中である。

#### 文献

1. 冷牟田修一, 他: 厚生省心身障害研究「マス・スクリーニングシステムの評価方法に関する研究」平成4年度研究報告書, 147, 1993
2. Thomas GR, et. al.: Am J Hum Genet, 54, 71, 1994



## 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: 新生児濾紙血セルロプラズミン(CP)の ELISA 測定によるウィルソン病の新生児マス・スクリーニングパイロットスタディを行った。1994年4月から12月までに札幌市内の医療機関からの総受付検体数13,861例の98%にあたる13,537例で本検査に対する保護者の同意が得られた。初回測定で仮のカットオフ値(CP:4-6mg/dl)を下回った検体は176例であり、同一検体による再測定の結果も低値を示した9例に再採血を依頼した。この内6例の再採血検査を行えたが、結果はいずれも正常であった。さらに確認検査法開発の基礎的検討としてウィルソン病患者10家系31例のリンパ球DNAを用いたマイクロサテライト多型/ハプロタイプ解析を行った。その結果、日本人ウィルソン病遺伝子に2種類の共通ハプロタイプ(いずれも4/12疾患染色体)が存在することがわかったが、これらのハプロタイプも含め、日本人ウィルソン病患者には欧米人の患者において報告されている遺伝子変異は認められなかった。今後、共通ハプロタイプの変異を明らかにすることにより、新生児期での確定診断への応用が可能になるものと期待される。