

ウィルソン病マススクリーニング法の改良 及び非活性セルロプラスミンに関する検討

冷牟田修一^{1,4}、大橋恭子¹、門田明彦¹、

池田 英紀²、吉田 博²、大森 大二郎³、藤岡芳美⁴、清水 教一⁴、青木 雅稔⁴

要約： ウィルソン病マススクリーニング用キットの簡便法への改良及び再検用の総セルロプラスミン(CP)値に占める活性CPを測定診断する方法の確立を目的に検討を行った。また、本スクリーニング法の特徴である活性CP、非活性CPの解析を行った。その結果、サンプルの希釈を行わない簡便法では検量線の直線性、C.V. 値共に良好で、希釈法と同等以上のものとなった。また、総CPと活性CPを比較する方法についても、検量線、C.V. 値ともに良好なものとなった。さらに、非活性CPはタイプ1銅を失ったアポCPであることが示唆され、ウィルソン病患者およびLECラットでのアポCPの出現とホロCPの著減が認められた。

見出し語： マススクリーニング、ウィルソン病、活性型セルロプラスミン、ESR

目的： ウィルソン病は血清CP値の低下及び肝への銅蓄積を特徴としているが、血清CPの低下はCP蛋白の減少のみでなく非活性CPの低下にも起因することがわかった¹⁾。ウィルソン病のマススクリーニングへの適用に向け、活性(ホロ)セルロプラスミンのみを測定する方法を確立し、報告した²⁾。しかし乍ら本マススクリーニング法はCPの血清中濃度が高い為に希釈を必要とするものであり、大量検体を処理するマススクリーニングの現場においては煩雑な作業となっていた。また、1次スクリーニ

ングで陽性と出た検体につき再検査をする際、活性CPの低下のみでなく、ウィルソン病患者で発現する非活性CPを定量することにより有効な指標を示すことが望まれる。本年はマススクリーニング法を希釈操作のない簡便法へ精度良く改良すること、再検査時に総CPと活性CPを測定、比較することによる2次スクリーニング法を提供することを目的として検討を行った。更に非活性CPの成因および性状の解析のためESR(電子スピニング共鳴)を用い、下記の事項の解析を目的とし検討を行った。

-
1. 出光興産中央研究所、
 2. ニッショ-総合研究所
 3. 順天堂大学医学部
 4. 東邦大学医学部

(1)非活性型CPがアポ型であることの確認 (2)非活性型CPは銅を含有するのか否か (3)非活性CPは3つあるタイプの銅のうちどのタイプの銅が欠如しているのか

方法と結果；①簡便法

測定法、原理は前年度本会議で報告したもの³⁾と同様である。図1に測定結果を示した。本年は特に低濃度域(5mg/dl以下)での精度向上の為、成分の最適化を検討した。その結果、低濃度域での良好なC.V.値、直線性を得ることができた。

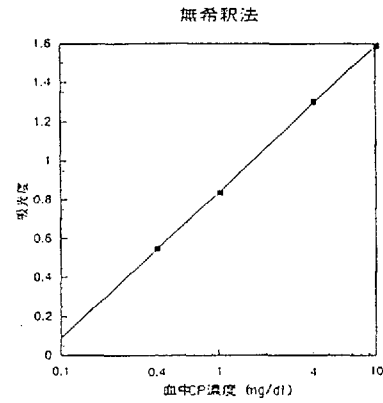
②活性CP、総CPの測定法

測定法、測定原理は前年度本会議で報告したもの³⁾と同様である。図2に標準物質を用いた測定結果を、図3に本法を用いてウィルソン病患者及び健常人血清を用いて測定した結果を示した。図2から明らかな様に検量線の直線性、C.V.値ともに良好な成績であった。また、本法により測定した結果、健常人ではCPの殆どが活性CPであったのに対し、ウィルソン病患者では総CPに占める活性CPの割合が半分以下となっていた。

③ESRを用いた解析

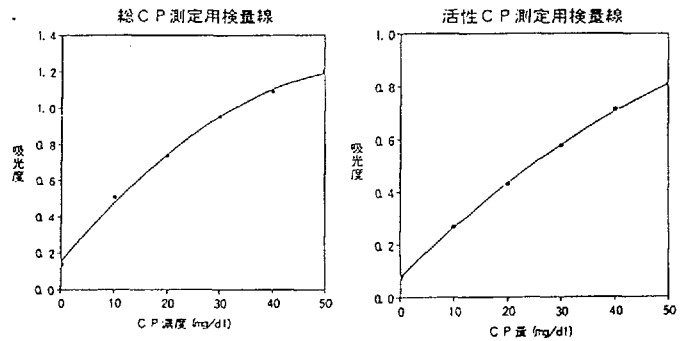
図4に測定条件と測定対象を示した。図5に精製標準CPを測定したものを示した。タイプI銅、タイプII銅のシグナル及びスーパーファインストラクチャーが観察される。LEAラット及びLECラット血清を測定した結果を図6に示した。LEAラットの場合は配位の状態を示すシグナル(スーパーファインストラクチャー)とタイプI銅のシグナルがきれいに現れていたのに対し、LECラ

図1.



CP濃度 (mg/dl)	O. D. (mean)	S. D.	C. V. (%)
0.1	0.134	0.015	11.2
1	0.931	0.117	12.6
10	1.595	0.283	17.8

図2.



CP濃度 (mg/dl)	O. D. (mean)	S. D.	C. V. (%)
0	0.135	0.013	9.34
10	0.507	0.007	1.47
20	0.736	0.025	3.36
30	0.949	0.016	1.65
40	1.086	0.034	3.13
50	1.201	0.005	0.39

CP濃度 (mg/dl)	O. D. (mean)	S. D.	C. V. (%)
0	0.077	0.001	1.11
10	0.268	0.009	3.48
20	0.429	0.01	2.28
30	0.577	0.027	4.37
40	0.712	0.004	0.5
50	0.805	0.034	4.2

図3. 測定結果

	総CP*	活性CP*
ウィルソン病患者 (n=4) 4~11.2	3.1 ± 0.0	1.2 ± 1.3
健常人 (n=4) 1~2.0	24.1 ± 0.7	23.5 ± 0.0

*mean ± 2SD (mg/dl)

図4. 方法と対象

1. 測定機器及び条件

機器: JEOL FE3XG spectrometer
 JEOL NMR gauss meter
 Advantest frequency counter
 Air Products LTR-3-110

条件: microwave frequency; 9.0 GHz
 microwave power; 10mW
 modulation amplitude; 1.0mT
 temperature; 10K

2. (1) 測定対象

LECラット (4例 9週令~24週令)
 LEAラット (4例 9週令~63週令)
 ウィルソン病患者 (6例)
 健常人 (4例)

(2) セルロプラスミン - 精製セルロプラスミン
 - 不活化セルロプラスミン

図 5.

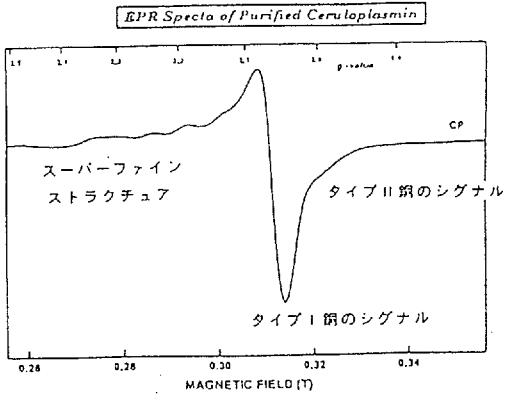


図 6.

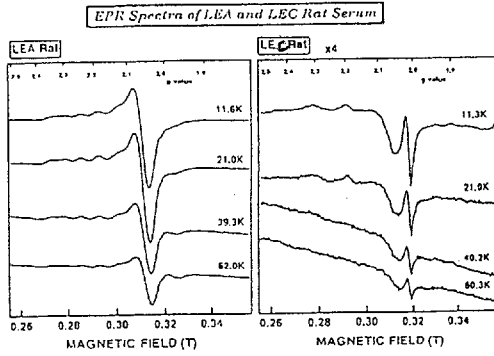


図 7.

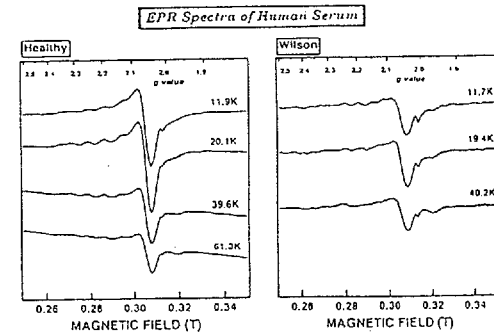
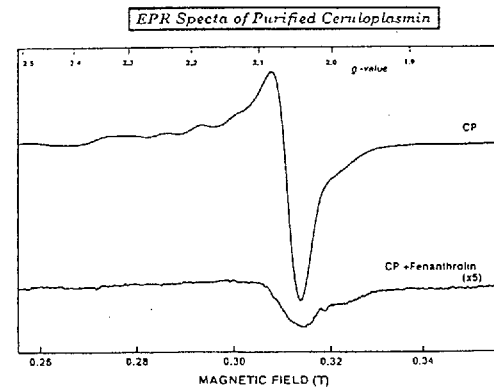


図 8.



ットでは配位のシグナル崩壊とタイプI銅のシグナルの減少が認められた。健常血清とウィルソン病患者血清とを測定したものを図7に示した。ウィルソン病患者ではLECラットと同様にタイプI銅の減少とスーパーファインストラクチャーの崩壊が観察された。精製CPをフェナンスロリン溶液を用いた透析により不活化したものを測定した結果を図8に示した。不活化されたアポCPはLECラット、ウィルソン病患者CPと酷似していた。

結論；①希釈操作のない簡便法は、検量線の直線性、同時再現性ともに良好であり、実際のマスキングの場合でも使用しうるものであることが示唆された。

②総CP、活性CPを各々定量する方法によりウィルソン病患者血中にアポCPの出現が確認でき、再検時の有効な指標となることが示唆された。

③ウィルソン病患者血中のCPは、その殆どがタイプI銅を失ったと思われるアポCPであり、活性を持つホロは著しく減少していた。

文献：

- 1)Hiyamuta S., Shimizu K. and Aoki T. Lancet, 1993 319, 342, 56-57
- 2)冷牟田修一他：厚生省心身障害研究平成5年度研究報告書, p133-1135
- 3)冷牟田修一他：厚生省心身障害研究平成6年度研究報告書, p14-16



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: ウィルソン病マススクリーニング用キットの簡便法への改良及び再検用の総セルロプラスミン(CP)値に占める活性 CP を測定診断する方法の確立を目的に検討を行った。また、本スクリーニング法の特徴である活性 CP、非活性 CP の解析を行った。その結果、サンプルの希釈を行わない簡便法では検量線の直線性、C.V. 値共に良好で、希釈法と同等以上のものとなった。また、総 CP と活性 CP を比較する方法についても、検量線、C.V. 値ともに良好なものとなった。さらに、非活性 CP はタイプI銅を失ったアポ CP であることが示唆され、ウィルソン病患者および LEC ラットでのアポ CP の出現とホロ CP の著減が認められた。