

尿中セルロプラスミン測定によるWilson病スクリーニングの研究
(分担研究：スクリーニングの新しい対象疾患に関する研究)

北川照男¹⁾、大和田 操²⁾、鈴木 健³⁾

【要約】 健常人の尿中には、ヒトセルロプラスミン(CP)抗体と反応する物質が存在するのに対し、Wilson病ではそれが検出されないことを昨年報告したが、本年度は尿中CP抗体反応物質(以下尿中CP)の性質の検索、および尿中CP測定によるWilson病スクリーニングの可能性に関する検討を行った。尿中CPの分子量は限外濾過法とWestern blottingにより検討し、その安定性についても検討した。健常人尿中には、分子量5~10万、および10万以上の画分にCP抗体反応物質が存在し、何れの画分でもPPD法によるcopper oxidase活性を認めた。尿Western blottingでも、血清CPと等しい部位に活性染色で陽性を示すバンドが検出された。尿CPは、4℃保存で少なくとも3日間は採尿当日と等しい測定結果を保っていたが、凍結保存になり著明な劣化を認めた。このことから、採尿および保存条件を適切に設定すれば、尿CP測定によるWilson病のスクリーニングは充分可能と考えられた。

【見出し語】 Wilson病、尿中セルロプラスミン、ELISA法、PPD法

【研究方法】

健常人の尿中には抗ヒトセルロプラスミン(CP)モノクローナル抗体と反応する蛋白性の物質が存在するのに対し、Wilson病患者の尿ではそれが殆んど検出されないことを、昨年度の本研究班において報告したが、本年度はこの物質(以下尿中CPとする)の性質に関する基礎的検討、並びに尿中CP測定によるWilson病のマス・スクリーニングの可

能性について検討した。

1) 尿中CPの性質の検討：表1に示す限外濾過法によって尿中CPの分子量を推定するとともに、Western blottingを行って血清CPの泳動パターンと比較した。
2) Wilson病スクリーニングの可能性の検討：尿を種々の温度条件で保存してCPを継時的に測定し、その安定性について検討した。CP測定には出光興

1) 国際学院埼玉短期大学 2) 日大小児科 3) 東京都予防医学協会

産社製抗ヒトCPモノクローナル抗体を使用したELISA法を使用した。

【研究結果】

1) 健常成人、小児および本症患者の尿中CP値は表2のようであり、Wilson病患者と健常者とは明確に識別可能であった。また、限外濾過法を用いて健常人の尿中CPを分画すると、表3のように、個々の検体でバラツキは認められるものの、分子量10万以上の画分、および、分子量5~10万の画分にCPが存在しており、分子量5万以下には認められ

なかった。このCPはELISA法のみでなく、p-phenylenediamineを基質とするcopper oxidase活性測定法(PPD法)でも検出可能であった。更に、Western blottingでは、血清と等しい位置に淡いながらCPのバンドが検出された。

2) 健常成人の尿を4℃で保存した場合には、図1のように、CP値が漸次低下したが、5日間の保存でも採尿当日の測定に比べて約80%が保持されていた。また、室温保存と4℃保存における尿CPを比

表1 限外濾過法による尿中CPの濃縮

- ① 尿 2ml をセントリコン(アミコン社)に注入
- ② 遠 沈 (15分, 30分)
MW 50,000 → 5,000 ×g
MW 100,000 → 1,000 ×g
- ③ tube を転倒し再遠沈
- ④ Retentate と Filtrate を分取
- ⑤ ELISA 法, PPD 法により, CP を測定するとともに Lowry 法で蛋白を測定

表2 健常人およびWilson病患者の尿中CP値 (ng/mg creatinine)

成人	(n=87)	64.27±31.97
小児	(n=19)	51.93±26.59
Wilson病患者 (n= 4)		4.05±2.70

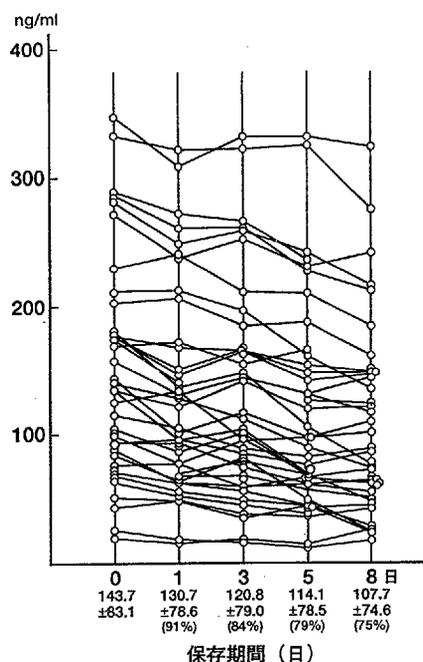


図1 4℃保存における成人尿中CPの変化

表3 限外濾過による尿中CPフラグメントの解析 (原尿2mlを使用した検討)

No	原尿2ml中のCP(ng)	原尿中の蛋白(mg/dl)	セントリコンMW10万			セントリコンMW5万		
			CPng*(%)	R**	F***	CPng*(%)	R**	F***
1	75	5.0	35 (47)	36%	64%	62 (83)	92%	8%
2	181	17.6	99 (55)	87%	13%	110 (61)	97%	3%
3	95	7.6	58 (61)	43%	57%	54 (57)	93%	7%
4	194	16.0	108 (56)	87%	13%	76 (39)	94%	6%
5	70	7.7	47 (67)	28%	72%	44 (63)	75%	25%
6	59	13.9	32 (54)	81%	19%	77 (130)	96%	4%

* (%)内はみかけの回収率
** R: retentate F: filtrate

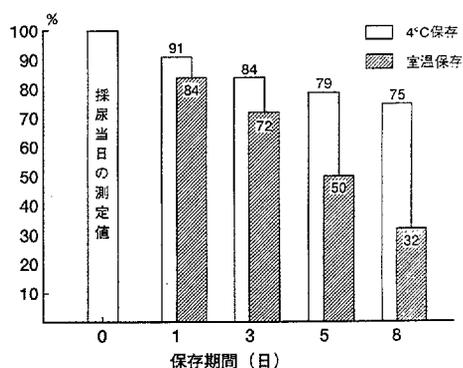


図2 保存温度条件による成人尿中CPの変化

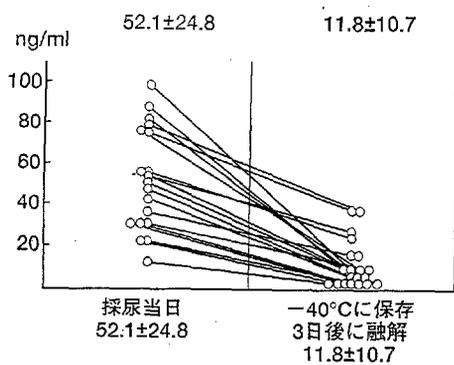


図3 3~15歳の早朝尿におけるCP値と凍結保存による変化

較すると図2のようであり、4°C保存では、少なくとも採尿1週間はCP測定が可能であった。これに対して尿を-40°Cで保存し、3日後に融解させて測定したCP値は、図3に示すように採尿当日に測定した値に比べて著しく劣化しており、凍結保存は尿CP測定には不適切であることが明らかにされた。

【考察】

以上述べたように、健常人尿中にはCPがnativeな形態とともに、分子量の小さいfragmentとして存在することが明らかにされた。しかも、Wilson

病患者の尿中には、この物質が殆んど存在しないことから、本症の診断に尿CP測定は有用な手段であると考えられた。また、採尿は採血に比べて非侵襲的手段であるため、尿中CP測定が本症のマス・スクリーニングに使用できれば良いと考えて、尿中CPの安定性についても検討を行った。その結果、血清の場合と異なり、凍結保存した尿中のCPは速かに失活することが明らかにされるとともに、4°Cで保存した場合、即ち冷蔵保存の場合には少なくとも採尿後5~7日間はCPは安定であることも示された。

このことから、採尿方法、検体輸送および尿保存条件を至適条件に保つことができれば、尿中CP測定によるWilson病のマス・スクリーニングは可能と考えられた。もちろん、大量の検体を処理することは、現時点では困難であるが、確実に採尿できて、しかも症状が発現する以前の時期、例えば小学校入学時などにおけるスクリーニングを検討することを、次の課題としたいと考えている。



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】健常人の尿中には、ヒトセルロプラスミン(CP)抗体と反応する物質が存在するのに対し、Wilson 病ではそれが検出されないことを昨年報告したが、本年度は尿中 CP 抗体反応物質(以下尿中 CP)の性質の検索、および尿中 CP 測定による Wilson 病スクリーニングの可能性に関する検討を行った。尿中 CP の分子量は限外濾過法と Western blotting により検討し、その安定性についても検討した。健常人尿中には、分子量 5~10 万、および 10 万以上の画分に CP 抗体反応物質が存在し、何れの画分でも PPD 法による copper oxidase 活性を認めた。尿 Western blotting でも、血清 CP と等しい部位に活性染色で陽性を示すバンドが検出された。尿 CP は、4 で保存で少なくとも 3 日間は採尿当日と等しい測定結果を保っていたが、凍結保存になり著明な劣化を認めた。このことから、採尿および保存条件を適切に設定すれば、尿 CP 測定による Wilson 病のスクリーニングは充分可能と考えられた。