

平成9年度厚生省心身障害研究  
「効果的なマススクリーニングの施策に関する研究」

日本人Wilson病の遺伝子診断への応用  
(分担研究：新しい対象疾患に対する研究)

中園宏紀\*, 山口之利\*, 竹下由紀子\*, 清水教一\*,  
青木継稔\*, 逸見仁道\*\*, 嶋武博之\*\*

要約：日本人Wilson病(WD)症例に対する遺伝子解析の結果をもとに、本症のマススクリーニングにおける遺伝子診断法の有用性について検討した。日本人WD症例20例に対し、末梢血より抽出したgenomic DNAを用いて、制限酵素切断法やMDEgel電気泳動法、direct sequencing法などを行い、WD遺伝子の変異を同定・確認した。Wilson病における遺伝子解析による診断は、特に幼少例において、非侵襲性であり有用であると思われた。Wilson病に対し遺伝子診断を行う場合、日本人に特徴的な変異の検索により、約70%は速やかにその診断が可能であると考えられたが、それ以外の症例には極めて広範囲に変異検索が必要であり、多くの時間や手間がかかると思われた。また、現時点においてはコストの問題もあり、一次スクリーニングに用いることは困難と思われた。しかし、対象がある程度絞られ、かつ時間的余裕がある二次スクリーニング、あるいは確定診断においては有用であると考えられた。

見出し語：Wilson病スクリーニング、遺伝子診断、ATP-7B

【目的】Wilson病は、常染色体劣性遺伝型式をとる先天性銅代謝異常症である<sup>1)</sup>。本症の発症頻度は、約3.5～4.5万人に1人と比較的頻度が高い。また本症は、銅キレート薬内服療法などの治療により、治療および発症予防が可能な疾患である。しかし、発症様式に多様性があり、確定診断・治療開始が遅れ、小児期に急激な肝不全となる劇症肝炎型などで死の転帰をとったり<sup>2)</sup>、進行例にて社会復帰困難例が比較的多い。これらのことより、本症をマススクリーニングする意義は大きいと思われる。1993年、Wilson病遺伝子(WDgene)がクローニング<sup>3)4)5)</sup>され、現在までに日本人Wilson病患者において、点突然変異、1塩基欠失・挿入、

splicingの異常<sup>6)</sup>などが報告されている。今回、我々は日本人Wilson病症例に対する遺伝子解析の結果をもとに、本症のマススクリーニングにおける遺伝子診断法の有用性とその位置づけについて検討した。

【対象および方法】対象は、臨床所見、生化学検査などよりWilson病と診断された日本人症例20例である。

方法は、患者の末梢血よりgenomic DNAを抽出し、Wilson病原因遺伝子(ATP7B)の変異を同定・確認した。PCR法、MDE gel電気泳動法などの技法を用いて、図1に示した方略にて遺伝子変異の検索を行い、最終的にはPCR増幅断片の塩基配列を決定して変異を同定した。

\* 東邦大学医学部第2小児科学教室 \*\* 同、分子生物学教室

【結果】 これまでに検索した日本人Wilson病における遺伝子変異の頻度は、R779L変異(exon8)と2874 delC変異(exon13)が高頻度に認められ、2つの変異で55%をしめていた(表1)。また、これらの変異は中国、台湾では報告されているものの、欧米では報告されていないことから、遺伝子変異に人種差があると思われた。

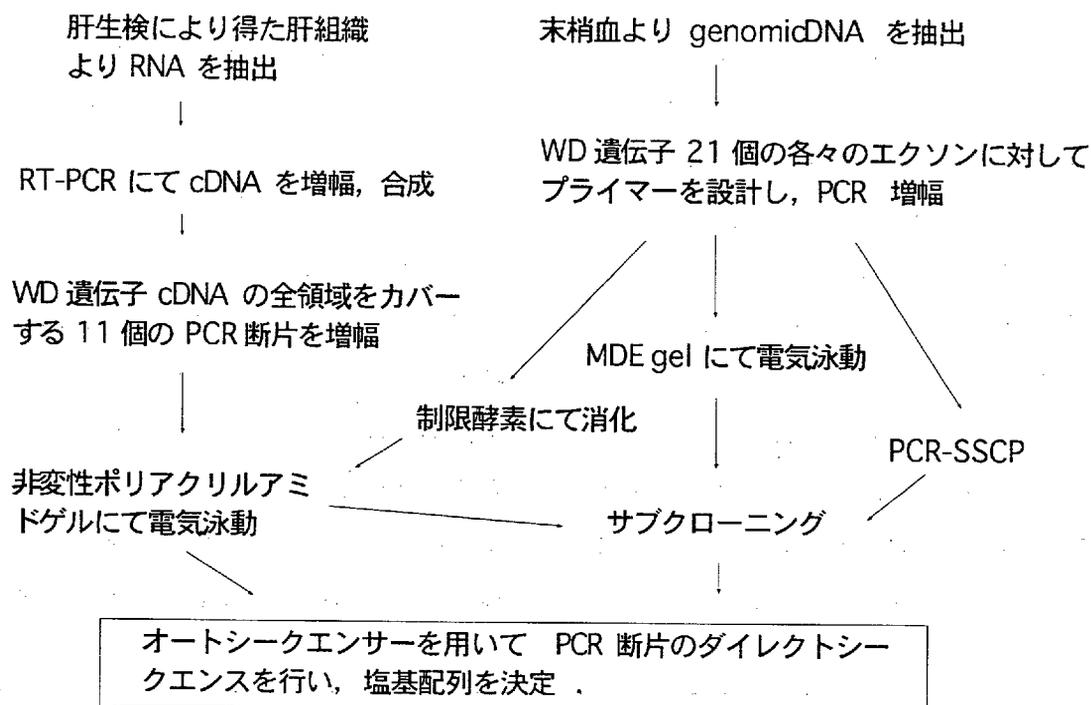
上記した遺伝子解析のprotocolにしたがい、乳幼児濾紙血のWilson病スクリーニング検査において陽性であった8ヶ月の男児について遺伝子解析を行った<sup>8)</sup>。本症例は、8ヶ月時、感冒の際、Wilson病のスクリーニング採血にて低活性型セルロプラスミン血症を指摘され、精査入院となった。本症の遺伝子検索を行ったところ、エクソン8の核酸2302番目にCの

表1 各遺伝子変異の頻度

Mutation	Exon	No. of alleles (40)	Frequency (%)
Missense			
Arg778Leu	8	10	25
Ala875Val	11	3	7.5
Arg920Gly	12	1	2.5
Thr1030Ile	14	1	2.5
Gly1035Val	14	1	2.5
Gly1187Ser	16	1	2.5
Asp1223Asn	17	1	2.5
Frameshift			
2302ins C	8	3	7.5
2514del A	10	1	2.5
2662del G	11	3	7.5
2874del C	13	12	30
Exon skipping			
1711T to G	5	3	7.5

insertionがあり、frame shiftを生じstop codonとなる変異を有するホモ接合体であった。本症例の家族内検索を行ったところ、9歳の姉が同様の変異のホモ接合体(患者)であり、また両親と6歳の姉は、ヘテロ接合体(保因者)であることが判明した。

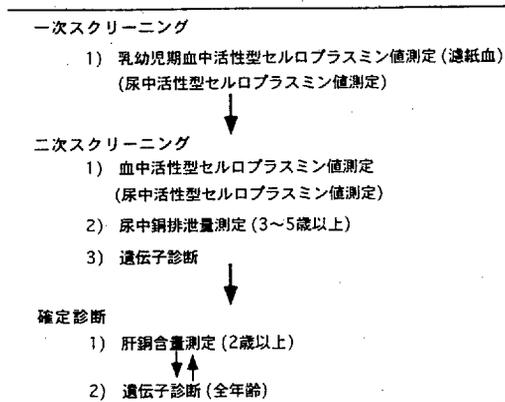
## 図1 遺伝子診断への方略



【考察および結論】Wilson病患者の約95～98%は、血中セルロプラスミンが正常者に比較して著しく低値を示し、特に活性型(ホロ型あるいは銅結合型)セルロプラスミンが極めて低値を示す<sup>7)</sup>。現在、低セルロプラスミン血症を指標とするスクリーニング法施行に向け様々な検討がなされている。そしてスクリーニング適期は3～5歳の幼児期が妥当であると考えられている<sup>9)</sup>。この年齢における本症の確定診断法としては肝銅含量の測定が最も信頼性が高い。しかし、本法は高い侵襲性を有する診断法である。Wilson病における遺伝子解析による診断は非侵襲性であり、また上記の乳児例における結果などより、特に幼少例において有用であると思われた。日本人Wilson病症例の遺伝子変異は、人種的特徴があるため、遺伝子診断を行う際、頻度の高い変異より検索することで効率よく診断できると思われた。日本人Wilson病に特徴的な変異の検索により、症例の約70%は速やかにその診断が可能であると考えられた。しかし、本症においては頻度の低い変異も非常に数多く存在する。頻度の高い変異が認められない症例については、極めて広範囲な変異検索が必要であり、多くの時間や手間がかかると思われる。また、現時点においてはコストの問題もあり、本法を一次スクリーニングに用いることは困難であると考えられる。

これらの結果をふまえ、Wilson病における一次スクリーニングから確定診断までの方略、および遺伝子診断の位置づけを検討した(図2)。一次スクリーニングは、乳幼児期における血中

図2 Wilson病における一次スクリーニングから確定診断までの方略



(あるいは尿中)活性型セルロプラスミン値測定にて行い、二次スクリーニング、あるいは確定診断において遺伝子解析を行うことが、遺伝子診断法の有効な利用法であると結論した。

#### 文献

- 1) 青木継稔：ウイルソン病，星和書店，東京，1984
- 2) 青木継稔，原まどか，鈴木真理子ほか：Wilson病の長期管理上の問題点，小児科，33：11-21，1994
- 3) Yamaguchi Y, et al: Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. Biochem Biophys Res Commun 197：271-277，1993

- 4) Bull PC, et al : The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet* 5 : 327-337, 1993
- 5) Petrukhin K, et al : Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet* 5 : 338-343, 1993
- 6) Shimizu N, Nakazono H, Aoki T, et al : The RNA splicing mutation in Japanese patients with Wilson Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 16-20, 1995
- 7) 青木継稔, 藤岡芳実, 久保田純子ほか : Wilson病のマスキングの実施と問題点, *小児科*, 35: 1079-1091, 1994
- 8) Shimizu N, Nakazono H, Aoki T, et al : Molecular diagnosis of Wilson's disease. *Lancet* 349: 1811-1812, 1997
- 9) 青木継稔, 山口之利, 清水教一ほか : 乳幼児後半から幼児を中心としたWilson病スクリーニング実施成績, 厚生省心身障害研究「効果的なマスキングの施策に関する研究」, 平成8年度研究報告書, p173-176, 1996



## 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:日本人 Wilson 病(WD)症例に対する遺伝子解析の結果をもとに,本症のマススクリーニングにおける遺伝子診断法の有用性について検討した.日本人 WD 症例 20 例に対し,末梢血より抽出した genomic DNA を用いて,制限酵素切断法や MDEgel 電気泳動法, direct sequencing 法などを行い, WD の遺伝子の変異を同定・確認した. Wilson 病における遺伝子解析による診断は,特に幼少例において,非侵襲性であり有用であると思われた. Wilson 病に対し遺伝子診断を行う場合,日本人に特徴的な変異の検索により,約 70%は速やかにその診断が可能であると考えられたが,それ以外の症例にては極めて広範囲に変異検索が必要であり,多くの時間や手間がかかると思われた. また,現時点においてはコストの問題もあり,一次スクリーニングに用いることは困難と思われた. しかし,対象がある程度絞られ,かつ時間的余裕がある二次スクリーニング,あるいは確定診断においては有用であると考えられた.