

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

尿によるウィルソン病のスクリーニングに関する研究（第3報）

研究要旨

Wilson病には薬物療法が有効であるが、診断が遅れて肝障害や神経障害を残す症例も少なく、従って、発症前に診断をする必要がある。

抗ヒト活性型セルロプラスミン（CP）モノクローナル抗体によるELISA法で尿と血液のCPを測定したところ、両者の間には正の相関関係がみられ、本症では正常対照者に比べて尿と血液のCP値が有意に低く、尿CPを測定してその早期診断が可能であった。しかし、少数ではあるが、これらの値が正常である症例もみられ、約5%の症例の早期発見は困難と思われた。また、糸球体障害を伴うものの尿CP値は高いので、注意が必要である。尿CP値は、試料を4℃で保存すると3日間位殆ど変化せず、特にグルコン酸クロルヘキシジン（CHG）を添加した容器内では尿CPは比較的安定であり、この尿のCPを測定して本症をスクリーニングするのが良く、確定診断には、血液CP、銅および尿銅の測定と、遺伝子解析が良いと思われた。

研究協力者

北川照男、鈴木 健（東京都予防医学協会）
大和田 操（日本大学小児科）

6) 健康診断のために採尿された学童26,180名の早朝尿を対象として、試験的スクリーニングを行った。

研究目的

腎糸球体疾患では、尿CPが増加するといわれているので、各腎疾患の尿CP値について検討し、同時にグルコン酸クロルヘキシジンを用いて、尿CPの安定化の検討を行った。平成10年度に引き続き、学校検尿のために採尿された尿の一部をWilson病の検査に使用することについて了解の得られた小学校の児童26,180名の早朝尿を対象として尿CPの測定を行った。

7) 尿CPはELISA法キット（株 ニッショー）を用いて測定し、尿クレアチニンはJaffe法で、尿銅は原子吸光法により測定した。

研究結果

1) 保存条件による尿CPの安定性

図1に示したように、CHGを添加せずに尿を室温に放置した場合は、3日目には72%、7日目には32%まで減少したが、CHGを添加した容器に入れて放置した場合は、CPの安定性が比較的保たれていた。また、4℃に保存した場合はCHGを添加した場合としない場合に、尿CPの安定性に大きな差はみられなかった。

2) 郵送による尿CPの変化

図2に示すように、普通の容器に尿を入れて郵送し検査室に到着後4℃に保存した場合は、3日目で平均87%であったが、一部で22%まで低下したものがあり、5日目は平均80%であったが一部は16%に低下した。これに対して予めCHGを添加した場合は、3日目は86-116%（平均100%）で殆ど低下せず、5日目になっても73-116%（平均95%）、また7日目でもほぼ同様であった。

3) 健康人およびWilson病患者における血清CPと尿CPの相関

健康人成人40例と尿蛋白や血尿を認めないWilson病患者19例の血液と尿CPの相関は、図3に示すように、 $r=0.846$ と正の相関が認められた。また、健康人とWilson病患者の血液CPおよび尿CPを比較す

研究方法および材料

- 1) グルコン酸クロルヘキシジン（CHG）を添加した容器および無添加の容器にそれぞれ尿を入れて、室温並びに4℃で2週間保存して尿CPの経時的変化を測定し、尿CPの安定性を検討した。
- 2) 尿CP測定を遠隔地の検査施設に依頼する場合も考慮して、77例の健康対照者の尿を郵送し、その前後で尿CPを測定し、検討した。
- 3) 尿蛋白や血尿を認めない健康人40例とWilson病患者19例の血清と尿CP値を測定して、両者の相関関係を求めた。
- 4) 各種腎疾患患者15例の尿CPと11例の血清CPを測定して、尿CP値に及ぼす各種腎障害の影響を検討した。
- 5) 健康幼児10例、小中学生51名、15歳以上の成人66例および、Wilson病患者44名の尿銅を測定し、比較検討した。

ると、何れもWilson病患者の値は健康対照者よりも統計学的に有意の差をもって低値を示していた。

4) 各種腎障害疾患における尿CP値

表1に示すように、糸球体障害をきたす疾患では126.9~2714.9ng/mg Cr.で明らかな高値を示し、特に尿と血清のCP値比の平均は39.0で、正常対照の平均値 4.8 ± 1.5 よりも著しく高かった。これに対して、糸球体疾患以外の各種腎疾患6例の尿CP平均値は464.0ng/mlで、糸球体疾患8例の平均値789.2ng/mlよりもかなり低かった。

5) 健康人およびWilson病患者尿銅値の比較

表2に示すように、正常幼児10例と小中学生51例および15歳以上の成人66例の尿銅値は、それぞれ平均 88.3 ± 34.4 ng/mg Cr. (44.3-156.7ng/mg Cr.), 73.9 ± 39.4 ng/mg Cr. (24.1-211.0ng/mg Cr.)および 48.7 ± 28.6 ng/mg Cr. (17.9-161.0ng/mg Cr.)であった。一方、全例にキレート剤を服用しているWilson病患者では 1222.3 ± 1523.3 ng/mg Cr. (117.5-5726.0ng/mg Cr.)であり、対照と比較して有意に高値を示していた。

6) 小学生児童の尿によるWilson病の試験的スクリーニング成績

1999年は26,180名の児童について、平成10年度と同様にスクリーニングを行い、図4に示すように一次スクリーニングにおいて275例(1.05%)が陽性となり、再採尿依頼を行った。再採尿に応じた261例の尿CPを測定したところ29例が再度陽性を示し、そのうち26例が精密検査を受診した。精密検査の結果、そのうちの1例での血清CP値、銅値が低く、Wilson病が疑われた。

7) 試験的スクリーニングで発見された2例目の患者の経過

スクリーニングにおいてWilson病が疑われた症例は11歳女児で、CPおよび銅の検査結果は血清CP7.0mg/dl、血清銅 $26.0 \mu\text{g/dl}$ 、尿銅117.2ng/mg Cr.で、血液一般検査ではヘパラスチンテストが61.0%と低値を示した以外何れも正常範囲であり、理学的には体格および栄養は正常で、肝脾腫、Kayser-Fleischer角膜輪は認められず、腹部エコーでも肝硬変は認められなかった。

これらの結果から、本症例がWilson病であることを確認するために、札幌市衛生研究所に遺伝子解析を依頼したところ、これまでに日本人のWilson病患者で報告されている遺伝子変異、即ちExon18 D1267N, Exon18 D1297N変異の複合ヘテロ接合体であることが確認された。

考察

Wilson病は、肝障害や神経症状から臨床的に疑

われて、血清、尿のCPや銅測定などの臨床検査によって診断されることが多いが、発症後3ヵ月以内に診断されるのは約半数で、症状が現われてから1年以上も経ってから診断される例も症例も少なくないといわれている。また、劇症肝炎の症状で発病して早期に死の転機をとる症例も少なくないので、マス・スクリーニングによって発症前に診断し、早期に治療を開始して予後を改善することが必要であり、本症のマス・スクリーニング法の開発が望まれている。

しかし、新生児期および月例の低い乳児では生理的に血清CPが低いので、新生児期に採取された濾紙血液のCPを測定してWilson病をスクリーニングすることは不可能である。他方、多数の幼児の血清CPを測定してWilson病を無症状のうちに発見して、早期治療を行ったという報告があるが、一般に幼児は採血を嫌うのでこの方法を本症のマス・スクリーニング法として普及することは困難と思われる。

我々は、糸球体疾患ではCPの尿中排泄が増加する云われていたもので、これを確認するために研究を進めていたところ、正常対照者の尿にかなりの量のCPが存在し、Wilson病患者の尿ではその値が著しく低いことを見出した。そして、本研究で腎糸球体疾患患者等の一部を除いて、血液CP値と尿CP値との間には正の相関があることを認め、血液と同様に尿のCPを測定しても本症を診断できることを確認した。

血液CPに比較して尿CPは不安定であるとされていたが、本研究において尿を4℃で保存すれば採尿後3日間位は比較的安定であり、特にCHGを添加しておいた容器に尿を入れて保存すれば信頼度の高い本症のスクリーニングが可能であると思われる。また、尿CPを測定してWilson病をスクリーニングする場合、採尿する家庭や医療施設から検査機関まで尿を運ばなければならず、数日間尿が室温で放置される可能性がある。このような条件下でも信頼度の高い尿CPの測定を行うには、予めCHGを添加しておいた容器を使用する必要があると思われる。

今回の検討で、Wilson病の大部分において低CP血症が認められたが、約4%の症例の血清CP値は正常対照に近い値を示していた。これまでの報告にあるように、血清CP値を測定して本症をスクリーニングする場合には数%の見逃しが生ずると云われており、尿CPを測定して本症をスクリーニングする場合も同じ程度の見逃しが生ずる筈であり、この点について、予め家族の了解を求めておく必要がある。我々の予備的研究においても糸球体疾患の尿では尿CP値が著しく高く、尿細管疾患を含む各種腎疾患においても尿蛋白が認められる症例においてその増

加がみられたので、尿CP値を測定して本症をスクリーニングする場合は、患児の腎障害の有無について注意が必要であろう。しかし、幼児では、尿蛋白が陽性になる頻度は極めて低く、また、Wilson病でも幼児期に腎臓に異常を合併する可能性は殆どないに等しいので、3歳児検尿の時にWilson病をスクリーニングする場合、殆ど問題はないと思われる。我々は、平成10年度と11年度の2年間に約44,800例の小学生児童の尿CPを測定して2例のWilson病を発症前に発見した。このことは、本法によるスクリーニングの信頼性を確認したものである。

しかし、小学生低学年の時期に行うスクリーニングでは、Wilson病患者の一部では既に発症していることも考えられる。

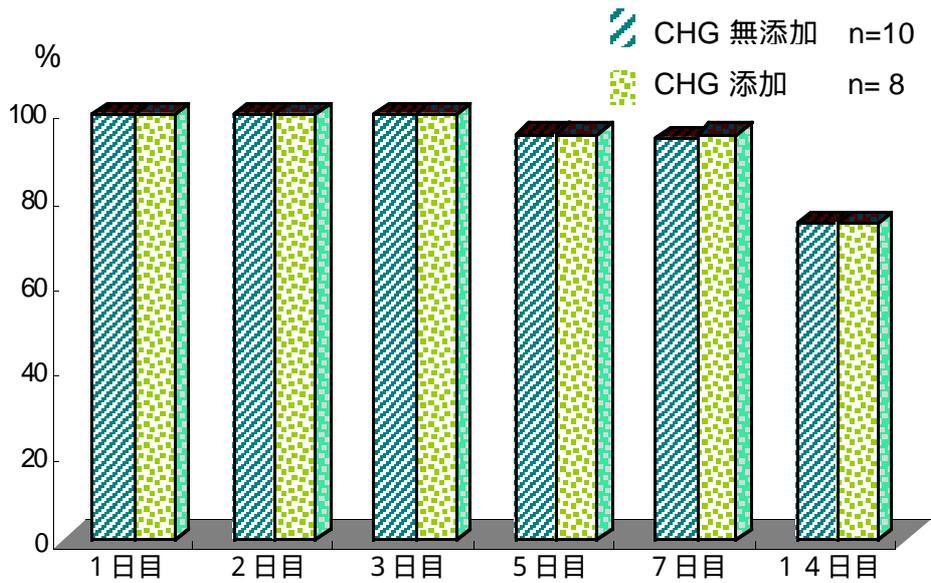
わが国において健康診断を目的とした三歳児の尿検査が全国的に行われているのでそのシステムを利

用して、我々は今後、三歳児尿を対象としたWilson病スクリーニング法およびそのシステム化を検討する予定である。

文献

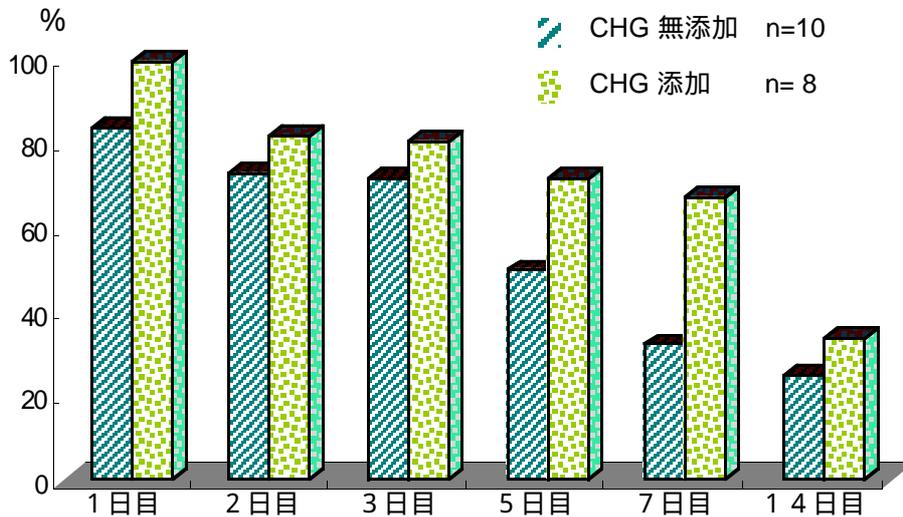
- 1) 鈴木健，山崎薫，穴澤昭，北川照男，大和田操：尿によるウィルソン病スクリーニング法の基礎的検討. 第27回日本マス・スクリーニング学会，名古屋，1999年10月
- 2) 北川照男，鈴木健，大和田操：尿によるウィルソン病のスクリーニングに関する研究（第2報）. 平成10年度厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）分担研究報告書 p68 - 71，1999

4 保存におけるCHG添加の影響



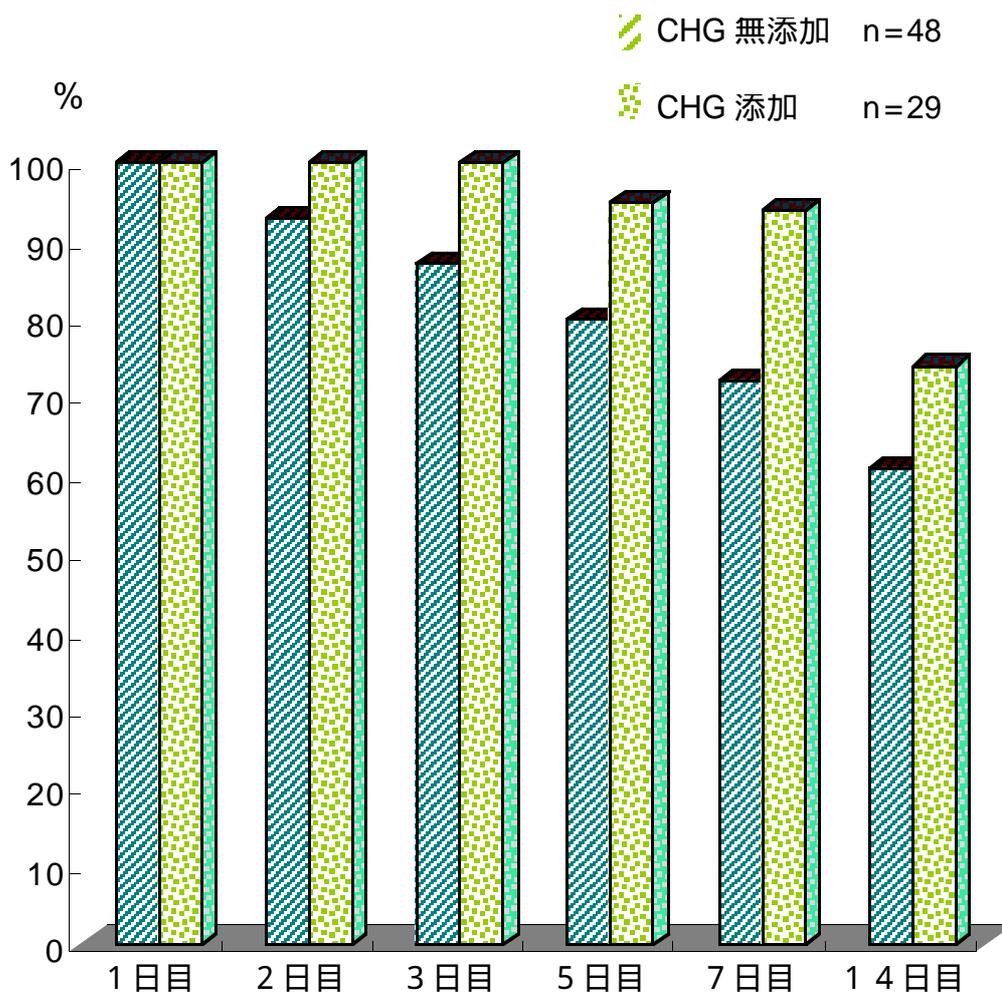
	1日目	2日目	3日目	5日目	7日目	14日目
CHG無添加	100	100	100	95	94	74
CHG 添加	100	100	100	95	95	74
(range)	91 - 117	78 - 112	86 - 117	73 - 116	73 - 118	47 - 108

室温放置におけるCHG添加の影響



	1日目	2日目	3日目	5日目	7日目	14日目
CHG無添加	84	73	72	50	32	25
CHG 添加	100	82	81	72	67	34
(range)	107 - 112	69 - 91	72 - 88	62 - 86	51 - 86	12 - 50

図1. 室温と4 保存における尿セルロプラスミン値の経時的変化
- グルコン酸クルルヘキシジン (CHG) 添加の影響 -



	1日目	2日目	3日目	5日目	7日目	14日目
CHG無添加	100	93	87	80	72	61
(RANGE)	61-116	42-109	22-109	16-117	11-103	7-101
CHG 添加	100	100	100	95	94	74
(RANGE)	91-117	78-112	86-117	73-116	73-118	41-108

図 2. 郵送された尿を 4 で保存した場合の尿セルロプラスミン値の経時的変化
- CHG 添加の影響 -

Wilson病患者 (n=19)

尿 CP 11.2 ± 9.2 ng/mg creat.

血液 CP 4.4 ± 3.4 mg/dl

尿CP / 血液CP 2.6 ± 1.8

健康成人 (n=40)

尿 CP 141.5 ± 40.9 ng/mg creat.

血液 CP 30.0 ± 3.6 mg/dl

尿CP / 血液CP 4.8 ± 1.5

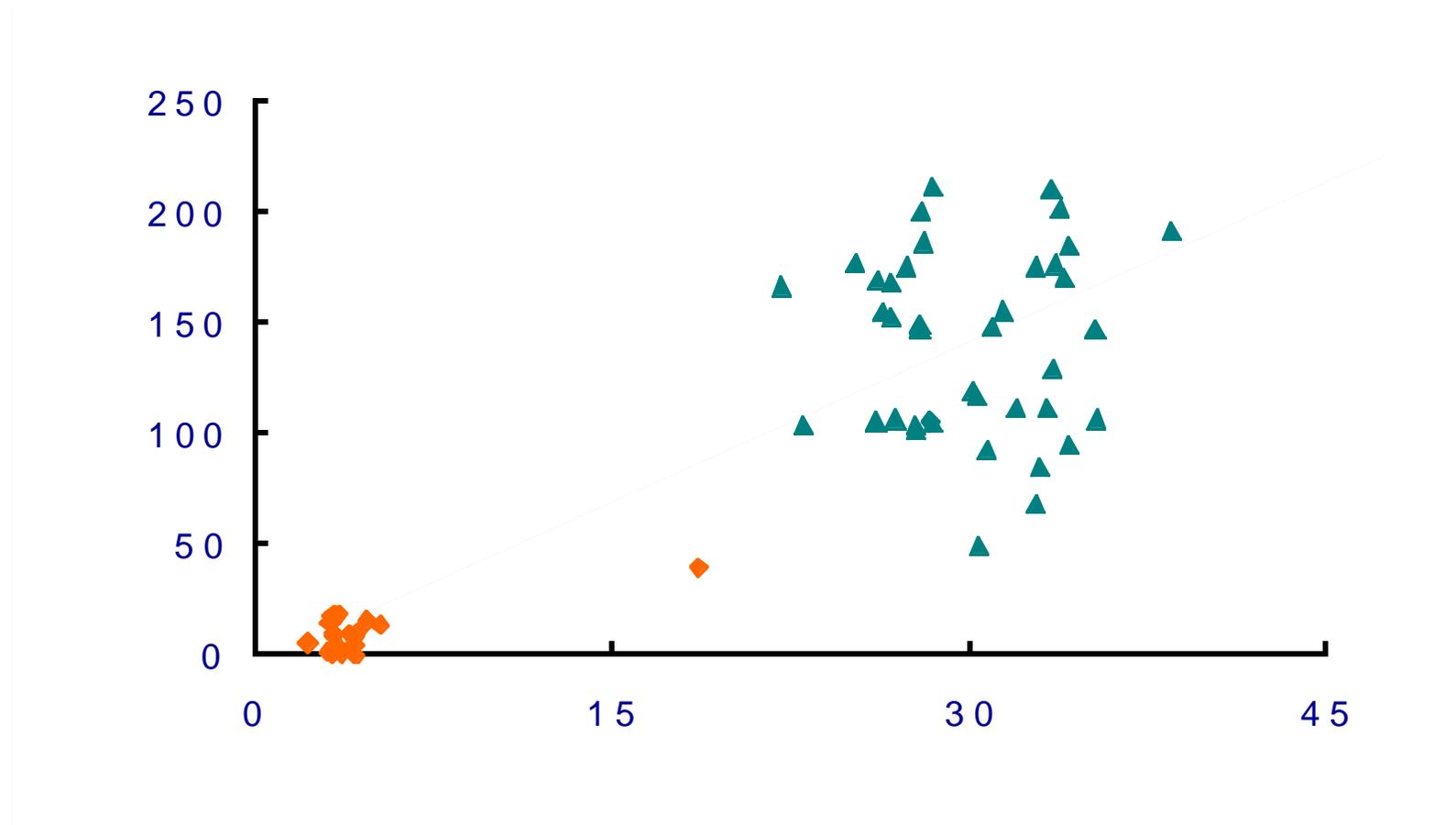


図3. 尿と血液セルロプラスミン値の相関関係

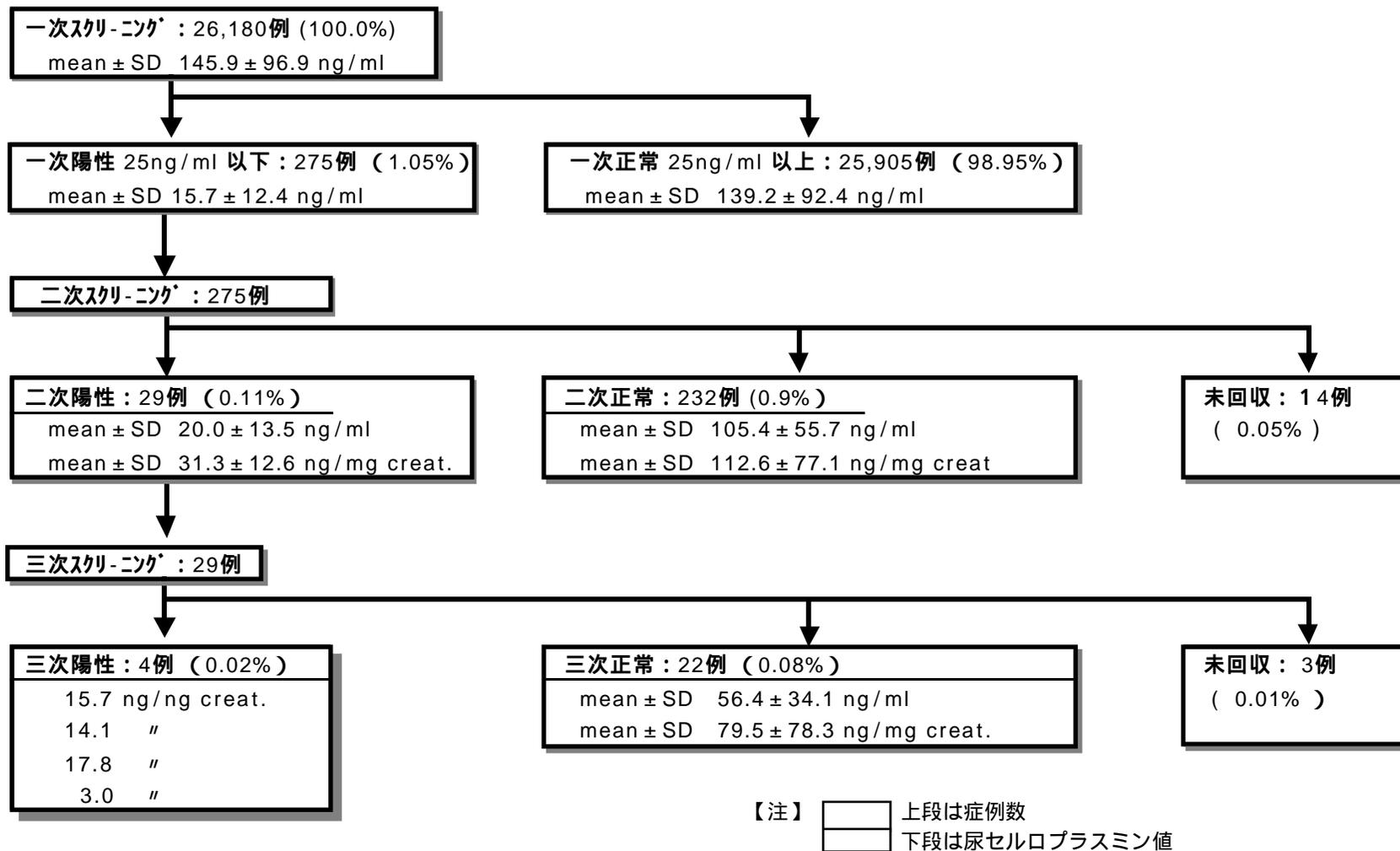


図 4. 平成 11 年度試験的マス・スクリーニング成績

1999.4.1 ~ 6.30

表 1. 腎疾患者の尿および血清 CP 値

1. 糸球体疾患

イニシアル	疾患名	尿一般検査		尿 C P		serum CP	urine/serum 比率
		蛋白	潜血	ng/ml	ng/mg creat	mg/dl	
K S	膜性増殖性糸球体腎炎(type)	++	+++	946.4	1091.6	14.6	74.77
S N	膜性増殖性糸球体腎炎(type)	±	+++	682.9	817.8	28.4	28.77
Y U	紫斑病性腎炎	+	+++	1388.0	892.0	31.4	28.41
Y K	硬化性糸球体腎炎	+	-	844.7	883.6	24.7	35.77
A M	初-セ 症候群	+++	-	679.7	634.6		
Y Y	ループス腎炎	++	+++	708.6	2714.9		
K H	IgA腎症	++	++	698.6	1383.4	19.7	70.22
M S	微小変化型ネフロ - セ	+++	++	364.4	126.9		
MEAN				789.2	1068.1	23.8	47.6

2. その他

イニシアル	疾患名	尿一般検査		尿 C P		serum CP	urine/serum 比率
		蛋白	潜血	ng/ml	ng/mg creat	mg/dl	
A Y	水腎症	±	-	243.8	320.8	44.7	7.18
K O	微少血尿	±	+	449.0	204.2	24.6	8.30
N N	原発性腎性酸血症	-	-	44.9	67.6	32.4	2.09
J M	ファンニ-症候群	++	-	264.3	649.4	26.1	24.88
H T	腎形成不全症	+++	+	1110.2	8103.6	54.1	149.79
K O	腎形成不全症	++	-	671.8	581.6		
MEAN				464.0	1654.5	36.4	38.4