

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

ウイルソン病患者尿中のヘム代謝産物の動態に関して

研究要旨

近年、ウイルソン病（WND）モデル動物を用いた実験により、銅代謝異常とヘム代謝異常の関連性が指摘された。そこで、本研究においては尿検体を用いてWND患者におけるヘム代謝異常の存在を検索すると共に、早期診断法としての検討を行った。WND患者尿検体は、WND友の会より提供を受けた31検体について実施した。

尿中 δ -aminolevulinic acid濃度は、健常対照群及びWND群の間に有意差は認められなかった。尿中総porphyrin濃度はWND群で健常対照群と比較し有意に低値であった。しかしながら、モデル動物においては、除銅効果（治療）により尿中へのporphyrinの排泄阻害が認められることから、WND群において認められた総porphyrin濃度の低値は治療に伴う減少である可能性が推測された。そこで、治療前の新規WND患者尿の分析を試みたところ、健常対照群と比較し、総porphyrin濃度とCopro. I濃度の異常な増加が確認された。

以上の結果から、WND患者においてもヘム代謝異常の存在が強く示唆されたが、尿中ヘム代謝産物を指標としたWNDの早期診断法としての検討を行う為には、治療前の患者尿検体を用いた検討が必要であることが明らかとなった。

研究協力者

中山憲司，市原侃，寺井格，田村正秀
（北海道立衛生研究所）
高澤啓，田村守（北海道大学電子科学研究所）
鈴木健（東京都予防医学協会）
山本重則，小川恵美（千葉大学医学部小児科）
長坂博範（埼玉医科大学小児科）
青木継稔（東邦大学医学部第小児科）

そこで、本研究においては、尿検体を用いてWND患者におけるヘム代謝異常の存在の有無を検索すると共に、早期診断法としての可能性に関する検討を行った。

研究方法および材料

本研究において用いた健常者尿検体は、北海道内で実施された学校検尿で正常と診断された小学1・3・6年生の尿検体の中から男女それぞれ24検体を無作為に抽出し、健常対照群として分析を行った。また、本研究において用いたWND患者尿検体は、治療中の安定期のWND患者尿検体をWND友の会より提供戴き、東京都予防医学協会において尿中銅濃度を測定後、-20℃のクール宅急便にて運搬し分析を行った。

ヘム代謝産物の測定は、porphyrin precursorである δ -aminolevulinic acid (ALA)¹⁴⁾と各porphyrin体濃度¹⁵⁾について行った。更に新規WND患者尿検体の分析では、Kennedy and Maslenの方法¹⁶⁾に従いporphyrin isomersについても解析を行った。得られた健常対象群とWND患者群の分析結果については、one-way ANOVAで統計解析を行った。

研究目的

近年、Nakayama et al.は、ウイルソン病（WND）モデル動物（LECラット）を用いた実験により、銅代謝異常とヘム代謝異常の密接な関連性を報告した^{1,2)}。LECラットは、病態生化学的^{3,4,5)}にも分子生物学的^{6,7,8)}にもヒトWNDに酷似していることが報告され、WNDにおける銅毒性発生機序の分子メカニズム解明や新規治療薬の有効性検索のために広く研究に用いられている⁹⁾。現在までに、ヒトWNDにおけるヘム代謝異常症の報告は、晩発性皮膚ポルフィリン症併発の症例報告があるのみであった¹⁰⁾。しかし、ヘム代謝過程を考慮すると、ヘム代謝はWNDにおいて特に著しい病変をとまなうミトコンドリア^{11,12)}と細胞質を介する代謝経路であること、また、鉄イオンを酸化する酵素はferroxidase、即ちceruloplasminであること¹³⁾などから、ヘム代謝異常とWNDとの関連性は十分に考えられるものであった。

研究結果および考察

Fig. 1に尿中ALA濃度の分析結果を示した。それぞれの尿中平均ALA濃度は、健常者群でおよそ 0.93 ± 0.36 mg/l、そしてWND患者群では 0.87 ± 0.54

mg/lとなり、両者の間には有意差は認められなかった。以上のことから、WND患者でもporphyrin precursorであるALAの尿排泄に異常は認められないことが明らかとなった。

Fig. 2に尿中porphyrin濃度の分析結果を示した。総porphyrin濃度は、健常者群でおよそ 120 ± 53.5 pmol/ml、そしてWND患者群では 49.7 ± 46.6 pmol/mlとなり、両群に顕著な有意差が認められ、WND患者群では健常対照群の半以下にporphyrinの尿排泄は低下していた。各porphyrin体について検討すると、Hexa.体・Penta.体・Copro.体において有意な減少が、更にProto.体において有意な増加が認められた。特に、WND患者群におけるCopro.体の減少は著しく、健常対照群のおよそ35%まで減少していた。以上のことから、治療中の安定期のWND患者においては、porphyrinの尿排泄は減少することが明らかとなった。

しかしながら、WNDにおいてD-penicillamine¹⁷⁾やtrientine^{18, 19)}を用いた治療が、骨髄等にヘム代謝障害を誘発することが報告されている。また、Takazawa et al. は、WNDモデル動物(LECラット)に、低銅食投与などの除銅効果を施すと、porphyrinの尿排泄障害をおこし、腎臓中に極めて多量のporphyrinが異常蓄積することを明らかにしている²⁰⁾。これらの知見から、本研究で明らかとなったWND患者における尿中porphyrin濃度の著しい低値は、治療に伴う変化である可能性が推測された。そこで、我々は治療開始以前のWND患者尿検体についても分析を試みた。

新規WND患者についての臨床情報を、TABLE 1に示した。本WND患者の治療開始以前の尿中ALA濃度は0.91 mg/lとなり、治療開始後の安定期WND患者の結果と同じく尿排泄異常は認められなかった。しかし、総porphyrin濃度は453 pmol/mlに達し、健常対照群のおよそ4倍と顕著な排泄増加が認められた。porphyrin体の中では、Copro.体の増加が顕著であり、健常対照群のおよそ4倍であった。また、porphyrin isomersについても分析を試みたところ(Fig. 3)、Copro. Iの顕著な上昇が認められた。Copro. IIは、健常者尿中においては総Copro.体(Copro. IとCopro. IIIの濃度合計)の10~40%程度しか存在していないと報告されている²¹⁻²⁴⁾。しかし、本症例における存在比率はおよそ70%に達し、総Copro.体の上昇はCopro. Iの尿排泄増加に起因することが明らかとなった。Copro. Iの異常尿排泄を示す代表的な疾患として、RotorIs症候群^{21, 22)}とDubin-Johnson症候群^{23, 24)}が知られている。本WND症例において認められたCopro. Iの尿排泄異

常は、総Copro.体の尿排泄増加も伴うことから、これらの症候群のうちRotorIs症候群に類似していると考えられた。しかしながら、本症例は既に急性肝不全を呈していることから、WNDにおいて常にRotorIs症候群様のporphyrinパターンを有するか否かの問題に関しては、肝機能障害を呈する以前の未治療WND患者の更なる尿検体分析が必要である。

本研究の結果から、WND患者においてもヘム代謝異常の存在が強く示唆された。また、WND患者におけるヘム代謝は、治療過程に伴い変化することが推測された。このことは、銅キレート剤の効果や副作用とヘム代謝異常との関連性に関する検索の必要性を示していると思われる。尿中ヘム代謝産物を用いたWNDの早期診断法としての有用性は、総porphyrin濃度やCopro. I濃度の増加が指標となりうる可能性はあるものの、現在のところ不明である。しかし、本研究により治療以前の新規患者検体を用いた調査の必要性が指摘されたことにより、今後の検討が待たれる。

我々は、WNDとヘム代謝異常との関連性の解明を試みると共に、新規WND患者の尿・血液検体を用いてヘム代謝の観点から早期診断法に関する検討を、今後も継続していきたいと考えている。

文献

- 1) Nakayama K, Takasawa A, Ohyama T, and Tamura M (1998). Abnormal accumulation of porphyrin derivatives in the kidneys of Long-Evans Cinnamon rats, as evidenced by microspectrophotometry. *Biochem Biophys Res Commun* 242:164-169.
- 2) Nakayama K, Takasawa A, Terai I, Okui T, Ohyama T and Tamura M (2000). Spontaneous porphyria of the Long-Evans Cinnamon rat: an animal model of Wilson's disease. *Arch. Biochem Biophys* in press.
- 3) Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, and Uchino J (1991). Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis: A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 87:1858-1861.
- 4) Okayasu T, Tochimaru H, Hyuga T, Takahashi T, Takekoshi Y, Li Y, Togashi Y, Takeichi N, Kasai N, and Arashima S (1992). Inherited copper toxicity in Long-Evans Cinnamon rats exhibiting spontaneous hepatitis: A model of Wilson's disease. *Pediatr Res* 31:253-257.

- 5) Suzuki M, and Aoki T (1994). Impaired hepatic copper homeostasis in Long-Evans Cinnamon rats: reduced biliary excretion of copper. *Pediatr Res* 35:598-601.
- 6) Yamaguchi Y, Heiny ME, Shimizu N, Aoki T, and Gitlin JD (1994). Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans cinnamon rat. *Biochem J* 301:1-4.
- 7) Sasaki N, Hayashizaki Y, Muramatsu M, Matsuda Y, Ando Y, Kuramoto T, Serikawa T, Azuma T, Naito A, Agui T, Yamashita T, Miyoshi I, Takeichi N, and Kasai N (1994). The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 202:512-518.
- 8) Wu J, Forbes JR, Chen HS, and Cox DW (1994). The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* 7:541-545.
- 9) Suzuki KT (1995). Disordered copper metabolism in LEC rats, an animal model of Wilson disease: Roles of metallothionein. *Res Commun Mole Pathol Pharmacol* 89:221-240.
- 10) Chesney TMC, Wardlaw LL, Kaplan RJ, Chow JF (1981) Porphyria cutanea tarda complicating Wilson's disease. *J Am Acad Dermatol* 4:64-66
- 11) Sternlieb I (1968) Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease. *Gastroenterology* 55:354-367
- 12) Sternlieb I (1992) Fraternal concordance of types of abnormal hepatocellular mitochondria in Wilson's disease. *Hepatology* 16:728-732
- 13) Harris ED (1995). The iron-copper connection: The link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr Rev* 53:170-173.
- 14) Tomokuni K, Ichiba M, and Hirai Y (1992). Measurement of urinary δ -aminolevulinic acid (ALA) by fluorometric HPLC and colorimetric methods. *Ind Health* 30:119-128
- 15) Ford RE, Ou C, and Ellefson RD (1981). Liquid-chromatographic analysis for urinary porphyrins. *Clin Chem* 27:397-401.
- 16) Kennedy SW, and Maslen AL (1989). Separation of porphyrin isomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 493:53-62.
- 17) Gollan JL, Hussein S, Hoffbrand AV, and Sherlock S (1976) Red cell aplasia following prolonged D-penicillamine therapy. *J Clin Pathol* 29: 135-139.
- 18) Condamine L, Hermine O, Alvin P, Levine M, Rey C and Courtecuisse V (1993). Acquired sideroblastic anaemia during treatment of Wilson's disease with triethylene tetramine dihydrochloride. *Br J Haematol* 83:166-168.
- 19) Perry AR, Pagliuca A, Fitzsimons EJ, Mufti R, and Williams R (1996). Acquired sideroblastic anemia induced by a copper-chelating agent. *Int J Hematol* 64:69-72.
- 20) Takasawa A, Nakayama K, Okui T, Terai I, Ohyama T and Tamura M (2000). Effects of copper and iron on spontaneous porphyria of the Long-Evans Cinnamon rat: an animal model of Wilson's disease. in submitting.
- 21) Wolkoff AW, Wolpert E, Pascasion FN, and Arias IM (1976) Rotor's Syndrome. *Am J Med* 60:173-179.
- 22) Shimizu Y, Naruto H, Ida S, and Kohakura M (1981) Urinary coproporphyrin isomers in Rotor's syndrome: a study in eight families. *Hepatology* 1:173-182.
- 23) Ben-Ezzer J, Rimington C, Shani M, Seligsohn U, Sheba C, and Szeinberg A (1971). Abnormal excretion of the isomers of urinary coproporphyrin by patients with Dubin-Johnson syndrome in Israel. *Clin Sci* 40:17-30.
- 24) Kondo T, Kuchiba K, and Shimizu Y (1976) Coproporphyrin isomers in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 70:1117-1120.

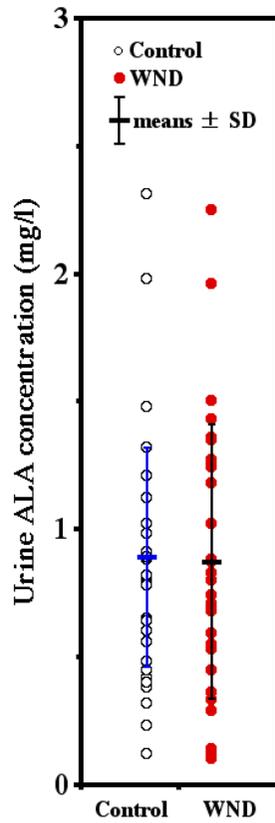


Fig. 1 ALA concentrations in the urine of controls and patients with Wilson's disease

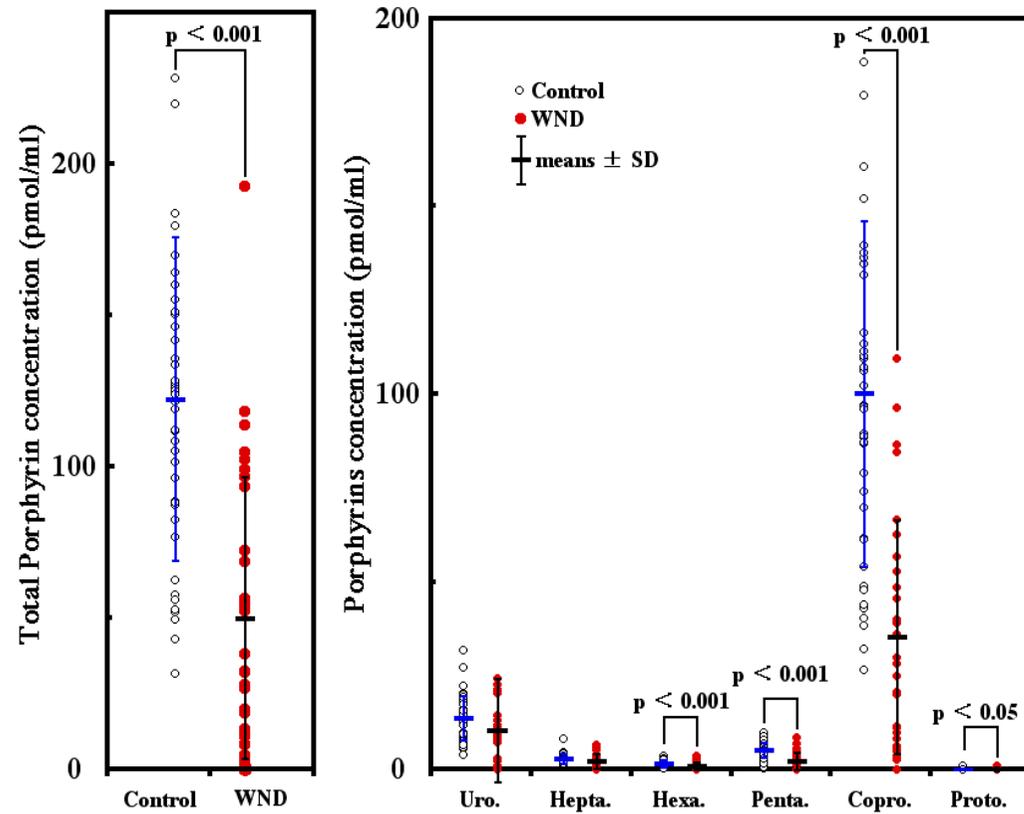


Fig. 2 Porphyrin concentrations in the urine of controls and patients with Wilson's disease

TABLE 1 Laboratory features of a patient with Wilson's disease

Name:	K. K. (male)
Age:	13 years old
AST:	139 U/l
ALT:	56 U/l
Total bilirubin:	10.7 mg/dl
Direct bilirubin:	7.2 mg/dl
Prothrombin time:	32 %
Serum ceruloplasmin:	7 mg/dl
Serum copper:	97 μ g/dl
Urinary total porphyrins:	453 pmol/ml
Urinary coproporphyrins:	374 pmol/ml

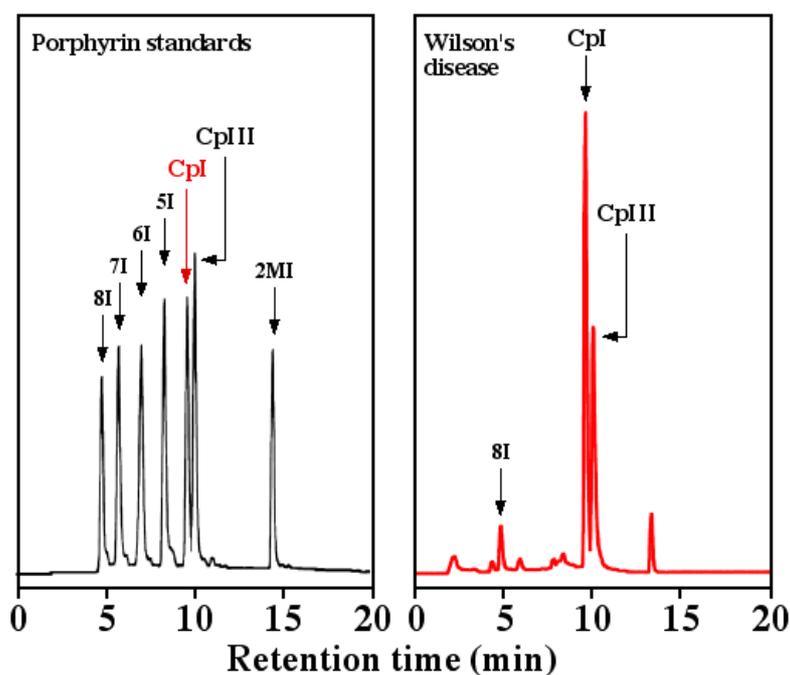


Fig. 3. Representative HPLC elution profiles of the porphyrin standards and the urine of the patient with Wilson's disease. The order of elution was uro- (8I), hepta- (7I), hexa- (6I), penta- (5I), copro- (CpI and CpIII) and meso- (2MI) porphyrin.