

また測定値に基づき年齢群別の正常値作成も進めて いきたい。

分担研究：効果的なマスキリング事業の実施に関する研究

Wilson病マスキリングの有効性に関する検討

研究要旨

Wilson病マスキリング・システム確立を目的として、その有効性を検討した。パイロット・スタディ成績より、尿中活性型セルロプラスミン値測定および乳幼児血中セルロプラスミン値測定による方法の特異度と陽性適中率を検討した。感度および陰性適中率は不明であった。各検査における感度、特異度、陽性・陰性適中率、さらにこの検査自体の有効性を正確に評価するためには、偽陰性例の発見など更なる検討が必要であると考えられた。発症前に診断、治療を開始されたWilson病症例の予後（状況）は、発症後症例あるいは全国調査成績よりも明らかに良好であり、本症の早期発見につながるマスキリングの意義が示唆された。

研究協力者

清水教一、青木継稔

（東邦大学医学部第2小児科）

三笠洋明

（徳島大学医学部衛生学教室）

研究目的

Wilson病は、常染色体劣性遺伝形式をとり、肝臓、角膜および中枢神経などの種々の臓器に銅の過剰な蓄積による障害を生じる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。本症の病態の中心は、肝臓における銅輸送膜蛋白ATP7B(P-type ATPase)の障害による銅の排泄障害であると考えられる。現在、血中あるいは尿中のセルロプラスミン値測定による本症のマスキリング・システムの確立が検討されており、パイロットスタディが全国の施設にて行われている。

本研究において筆者らは、Wilson病マスキリングの有効性を検討する目的にて、1)パイロット・スタディにおける患者発見の感度と特異度、2)マスキリング・パイロットスタディを含め発症前に発見・診断された症例の状況を発症後に診断された症例、および全国調査成績と比較検討した。

研究方法

- 1.平成10年度厚生省子ども家庭総合事業の報告書を中心に、Wilson病マスキリング・パイロットスタディの成績より、患者発見の感度と特異度を検討した。
- 2.東邦大学医学部第2小児科学教室において、マスキリング・パイロットスタディを含め発症前に診断し治療が開始されたWilson病症例の状況を、当教室にて発症後に診断された症例、および全国調査成績と比較検討した。

研究結果

1.Wilson病マスキリング・パイロットスタディ成績

- 1) 新生児期血中活性型セルロプラスミン値測定
3年間に全国にて約165,000例に対して実施された。しかし患児は1例も発見されなかった。
- 2) 乳幼児期血中セルロプラスミン値測定
生後6か月から9歳までの乳幼児（一部学童）を対象とした。東邦大学医学部第2小児科学教室において過去21年間に累計約28,000例に施行され、3例が発見・診断された。
- 3) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
累計約23,000例に対し施行された。対象は学童が中心であり、1例が発見・診断された。（北川ら、1999）

2. Wilson病スクリーニング成績の評価

- 1) 乳幼児期血中セルロプラスミン値測定
15mg/dlをcut off値とした場合、特異度は0.9961、陽性適中率は0.08273であった。
20mg/dlをcut off値とした場合は、それぞれ0.9836、0.0066であった。感度と陰性適中率は不明であった。
- 2) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
15ng/mlをcut off値とした場合、特異度は0.993506、陽性適中率は0.006757であった。
15ng/mgCrをcut off値とした場合は、それぞれ0.999514、0.083333であった。感度と陰性適中率はやはり不明であった。
3. 発症前に診断、治療を開始されたWilson病症例の予後（状況）

Wilson病全国調査における本症症例の状況と転帰を表1に、発症前Wilson病症例と発症後症例との状況の比較を表2に示す。発症前に診断され、治療が開始された症例は、全例臨床症状を認めず、通常の生活を送っている。また、超音波検査による肝臓の

形態学的検索においても、軽度の肝障害が約30%の症例に認められたのみであった。

考察

乳幼児血中セルロプラスミン値測定および尿中活性型セルロプラスミン値測定によるWilson病マスキング・パイロットスタディの結果よりは、それぞれの特異度と陽性適中率が判明し、ともに良好な値を示した。しかし、各検査における感度、陰性適中率、さらにこの検査自体の有効性を正確に評価するためには、偽陰性例を発見し、その発見率を求めることが必要である。特に本症においては、全例の3-5%に血中セルロプラスミン値正常例が存在することが知られており、今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

発症前に発見・診断され治療が開始されたWilson病症例は、その予後と転帰が発症後に診断された症例および全国調査成績に比べ明らかに良好であった。本症症例を早期（発症前）に発見する事を目的とするWilson病マスキング・シス

テム確立の意義と、その有効性を示唆させる結果であった。

結論

1. Wilson病マスキング・システム確立を目的として、その有効性を検討した。
2. パイロット・スタディ成績より、尿中活性型セルロプラスミン値測定および乳幼児血中セルロプラスミン値測定による方法の特異度と陽性適中率を計算した。ともに良好な値を示していた。
3. 各検査における感度と陰性適中率、さらにこの検査自体の有効性を正確に評価するためには、偽陰性例の発見など更なる検討が必要であると考えられた。
4. 発症前に発見・診断され治療を開始されたWilson病症例の予後と転帰（状況）は、発症後症例あるいは全国調査成績よりも明らかに良好であり、本症の早期発見につながるマスキングの意義が示唆された。

表1. Wilson病症例における状況と転帰

	Male	Female	Total
ふつうの日常生活を行っている	136 (68.3)	109 (72.7)	245 (70.2)
自宅療養中	21 (10.6)	29 (13.3)	41 (11.7)
療養所に入所中	11 (5.5)	3 (2.0)	14 (4.0)
病院にて入院加療中	14 (7.0)	9 (6.0)	23 (6.6)
死亡	17 (8.5)	9 (6.0)	26 (7.5)
Total	199 (100)	150 (100)	349 (100)

()内は%

(青木継稔ら, 1992)

表2. 発症前Wilson病症例における状況（発症後症例との比較）

	症例数	経過（年）	肝症状	神経症状	超音波検査上の肝障害
発症前型	12	1-37	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (33.3)
肝型	7	0-12	3 (42.8)	0 (0.0)	5 (71.2)*
肝神経型	6	1-25	2 (33.3)	4 (66.7)	5 (83.3)**
神経型	8	0-29	0 (0.0)	7 (87.5)	6 (75.0)*
劇症型	1	15	0 (0.0)	1 (100)	1 (100)

()内は%

* 2例は不明

** 1例は不明

分担研究：効果的なマスキリ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）

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。

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 \pm 0.36 mg/l、そしてWND患者群では0.87 \pm 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分以下に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、Rotor's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Rotor's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Rotor's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た。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) Shimuzu 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.

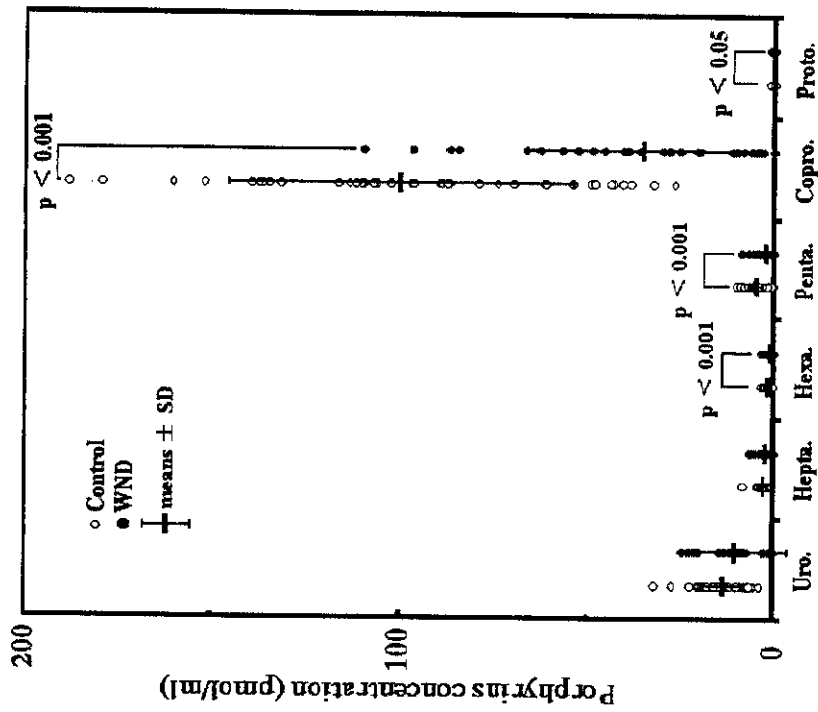
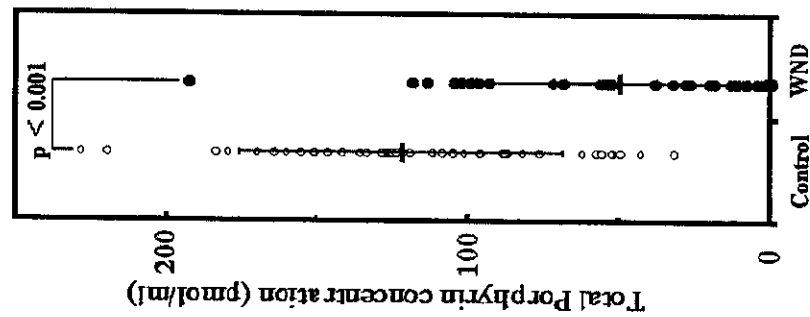
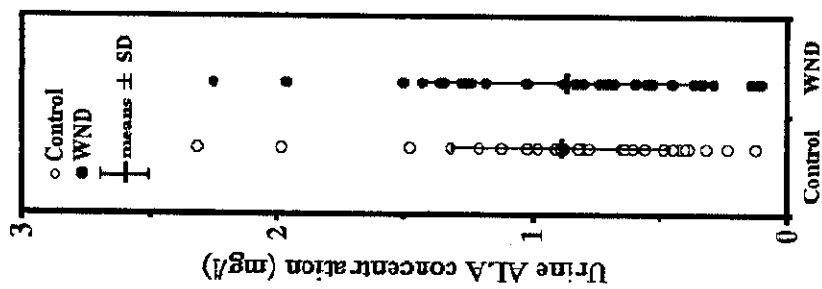


Fig. 1 ALA concentrations in the urine of controls and patients with Wilson's disease

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

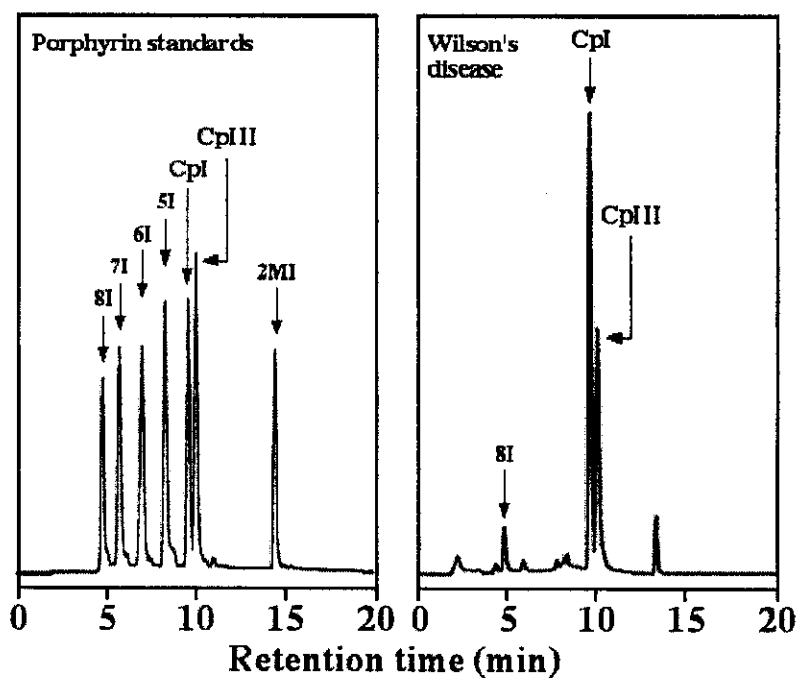


Fig. 3. Representative HPLC elution profiles of the porphyrin standards and the urine of the patient with Wilson's disease. The order of elution was uro- (8I), hepta- (7I), hexa- (6I), penta- (5I), copro- (CpI and CpII) and meso- (2MI) porphyrin.

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

Wilson病マススクリーニングにおけるATP7B遺伝子解析および
蛋白活性測定的位置づけとその方略に関する検討

研究要旨

Wilson病診断のためのATP7B遺伝子解析と銅特異的ATPase活性測定の方略を検討した。さらに本症マススクリーニング・システムにおけるこれらの方法の位置づけについての検討を行った。ATP7B遺伝子解析は、まず高頻度に認められる変異をARMSなどを用いてスクリーニングすることにより効率よく解析が行えると考えられた。銅特異的ATPase活性測定は、診断に有効であることが示唆されたが、現時点においてはリンパ球を培養する必要が問題点であり、また今後は症例数を増やしての検討が必要であると考えられた。これらの診断法は、Wilson病マススクリーニングにおいて、非侵襲的確定診断法として有効であると考えられた。

研究協力者

清水教一，竹下由紀子，宇野久仁子，青木継稔
（東邦大学医学部第2小児科）
逸見仁道，嶋武博之
（東邦大学医学部分子生物学）

研究目的

Wilson病は、常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。肝臓、角膜および中枢神経などの種々の臓器に銅の過剰な蓄積による障害を生じる。本症は、ATP7B遺伝子より産生される銅輸送膜蛋白(P-type ATPase)の障害により生じると考えられる。その病態の中心は、肝臓における銅の排泄障害であると推測されている。本症の診断は、血中セルロプラスミン値の低下、尿中銅排泄量の増加あるいは肝細胞中への銅の蓄積の証明などにて行われている。しかし、今後マススクリーニングにより発見されると予想される年少例は、確定診断が困難なことが多く、可能な限り非侵襲的な確定診断法を確立することが必要である。

本研究において筆者らは、Wilson病の診断法としてのATP7B遺伝子解析と銅依存性ATPase活性測定について、本症マススクリーニングにおける位置づけと方略を検討した。

研究方法

1. ATP7B遺伝子解析

対象は、Wilson病症例20例であった。

方法：1) 患者末梢血よりgenomic DNAを抽出した。2) このDNAに対して、PCR-SSCP法などを用いて変異を有するexonを検索した。3) 変異の生じる可能性の高いexonよりdirect sequence法にて変異を検索した。4) 最終的には変異を有すると考え

られるexonの塩基配列を決定し、変異を同定・確認した。

2. 銅特異的ATPase活性測定

対象は古典的Menkes病症例1例とその母親（保因者）、Wilson病症例5例、および正常コントロール2例であった。

方法（銅特異的ATPase活性測定）：1)上記した対象のリンパ球をEB virusにて不死化し培養した。2)細胞を溶解し、膜成分を抽出した。3)Sodium azide, ZnSO₄, Ouabainにて非特異的にATPase活性を阻害した。4)ATPおよびCuSO₄を加え、37℃ 60分反応させ銅特異的ATPaseを活性化した。5)発色剤を加えA820nmを測定することにより、ATPの酸化的リン酸化の変化を測定した。

研究結果

1.Wilson病症例に対するATP7B遺伝子の構造解析を行った結果、13種類の変異が同定された。内訳は、missense mutationが7種類、1塩基欠失が、4種類、1塩基挿入が1種類およびスプライシング異常が1種類であった。そのなかで、2874delC, Arg778Leu, Ala875Val, 2302insCおよび2662delGが比較的高頻度に認められた。

2.正常コントロールにおける銅負荷後の値を100%として、Wilson病症例における銅特異的ATPase活性を比較した。その結果、5症例は、それぞれ46.8±4.1, 47.5±4.6, 48.2±1.9, 53.2±7.4, 56.1±3.3および60.5±0.3%と、明らかに低い値を呈していた。

考察

Wilson病症例に対する遺伝子診断は、既知の比較的頻度の高い変異についてまずスクリーニングを行うことにより、効率よく行えると考えられる。本症の遺伝子変異は、点突然変異と1塩基挿入・欠失がほぼ同じ頻度にて認められるため、それらの変異の同定にはAmplification refractory mutation system (ARMS)が有効であると考えられた。本法は、PCR反応においてプライマーの3'末端の塩基が変化するとアニーリングしない特徴を利用している。既知の遺伝子変異に対して、変異部位が3'端になるようにオリゴヌクレオチドを、一つはwild type、もう一方はmutantの塩基配列を持つように2種作成する。他方は共通プライマーを用いる。これらを用いて一つの変異検索に関して2種のPCR反応を行い、どちらのプライマーを用いた反応にて増幅がなされるかをみる。すなわち、その部位が正常であればwild typeのみ、homozygousな変異であればmutantのみ、そしてheterozygoteであれば両方とも増幅される。現在筆者らは、Wilson病において比較的頻度が高い、2302insC (exon 8), 2514delA (exon 10), 2662delG (exon 11), 2874delC (exon 13), R778L (exon 8), A874V (exon 11), R920G (exon 12), G1187S (exon 16)およびN1270S (exon 18)の9種類の変異についてARMSによる解析を行っている。この方法により、全alleleの60-70%の変異を同定できると考えられる。

また、培養リンパ球における銅特異的ATPaseの

活性の測定は原因蛋白の機能を直接測定する方法であり、その低下を証明することにより本症を診断することが可能であると考えられた。しかし、本法はATP7Aと7B蛋白の活性を同時に測定しており、今後は選択的にATP7B蛋白の活性を測定する方法の開発が望まれる。

ATP7B遺伝子解析および銅特異的ATPase活性測定を用いたWilson病診断の方略を図1に示す。ARMSとダイレクト・シーケンス法を中心として遺伝子解析を行い、変異が同定されない症例に対しては培養リンパ球を用いた活性測定を行うことにより診断が可能であると考えられる。また、これらの方法は必要とする技術、時間およびコストの問題により、一次あるいは二次スクリーニングに用いるのは困難であるが、非侵襲的な確定診断法として有用であると考えられる(図2)。

結論

Wilson病診断のためのATP7B遺伝子解析と銅特異的ATPase活性測定の方略と、本症マススクリーニングにおける位置づけについての検討を行った。遺伝子解析は、まず高頻度に認められる変異をスクリーニングすることにより効率よく解析が行えると考えられた。また、銅特異的ATPase活性測定も診断に有効であると考えられた。これらの診断法は、Wilson病マススクリーニングにおいて、非侵襲的確定診断法として有効であると結論した。

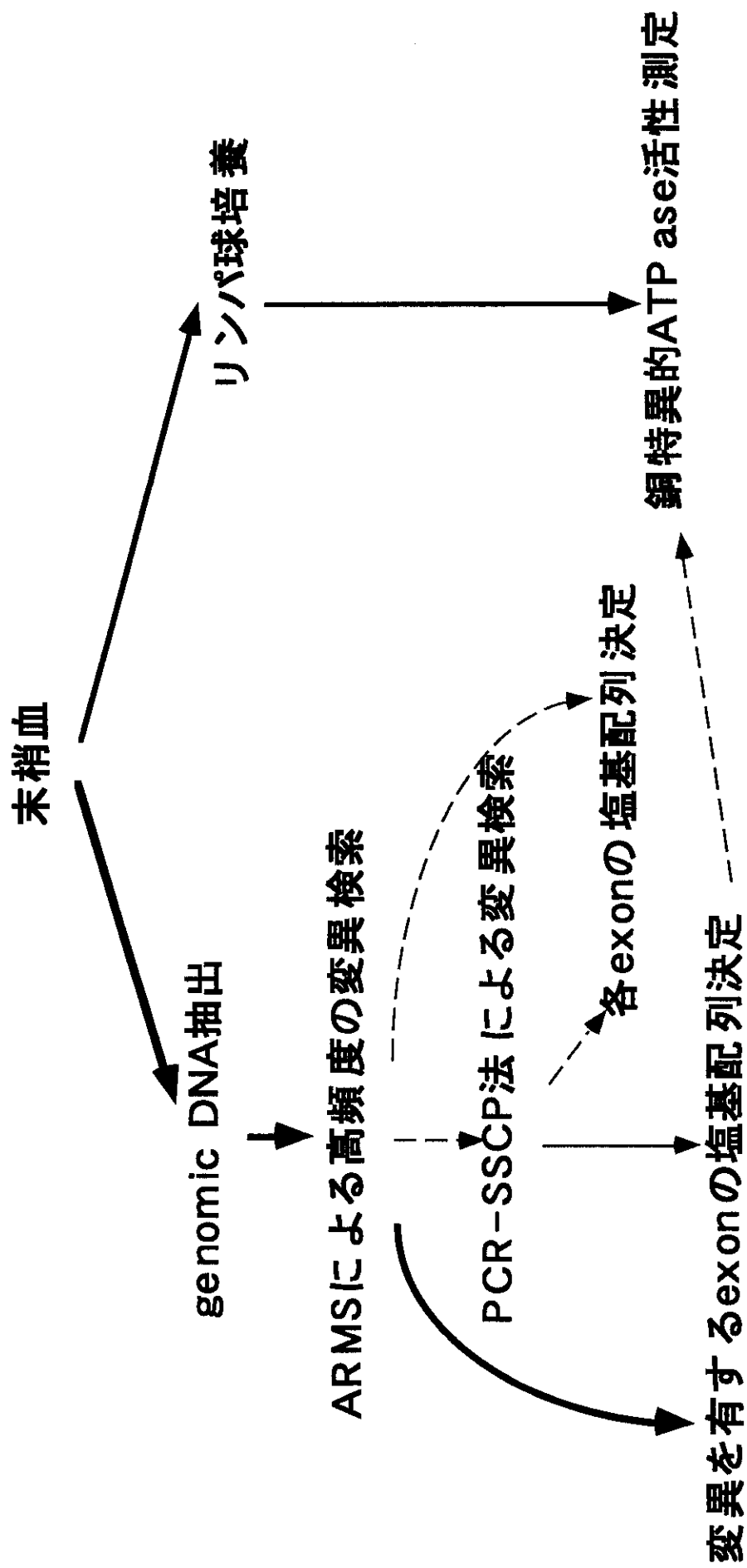


図1. Wilson病診断における遺伝子解析およびATPase活性測定の方略

一次スクリーニング

- i) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
- ii) 乳幼児期血中活性型セルロプラスミン値測定
(濾紙血)



二次スクリーニング

- i) 尿中活性型セルロプラスミン値測定
- ii) 血中活性型セルロプラスミン値測定
- iii) 尿中銅排泄量測定



確定診断

1. 3歳以降

- i) 肝銅含量測定 and/or 胆汁中銅排泄量測定
- ii) 尿中銅含量測定
- iii) 遺伝子解析
- iv) ATP7B 活性測定

2. 1.5～3歳未満

- i) 肝銅含量測定
- ii) 遺伝子解析
- iii) ATP7B 活性測定

図 2. Wilson 病マススクリーニングにおける ATP7B 遺伝子解析および蛋白活性測定の位置づけ

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

簡易尿ウレアーゼ法による有機酸血症のスクリーニング
—プロピオン酸血症，メチルマロン酸血症を中心に—

研究要旨

簡易尿ウレアーゼ法¹⁾とはろ紙尿あるいは原尿にureaseを加えて、大過剰に存在し分析を妨害する尿素を分解して除去した後、有機酸、アミノ酸、糖、糖アルコール、プリン、ピリミジンの代謝中間体をTMS誘導体としてGC/MSで一斉分析する方法で、通常0.1mlの尿で有機酸血症を含む多くの代謝異常症が化学診断できると考えられる。今回、ろ紙尿のタンデムマスにより検出された無症状の28生日児を含むプロピオン酸血症（PCC）の4例を本法で分析したところ、指標物質であるメチルクエン酸のジアステレオマー1, 2のSD異常度（mean + n SDにおけるn値）は無症状児でもそれぞれ、37, 32と異常高値で、後に肝移植を受けた重症例ではそれぞれ1,600, 600と超異常高値であった。一方、羊水のメチルクエン酸を指標としてPCCの出生前診断ができる事実も考慮すると、本法により発症前のPCCも新生児期に殆ど見落しなく検出できるものと推定された。一方、メチルマロン酸尿症（MMA）の本法による感度、特異度については新生児マススクリーニング試験研究で2例（低～中等度の高排泄者で現在も無症状）が発見されたことから、簡易尿ウレアーゼ法でも良性で経過する可能性の高いMMAを高感度で検出できること、従って、MMAの新生児が偽陰性となる可能性は極めて低いことが確認された。

研究協力者

久原とみ子，井上義人，大土井千恵，
大瀬守眞，新家敏弘

（金沢医科大学総合医学研究所
人類遺伝学研究部門生化学）

研究目的

早期診断，早期治療が有効で，発生率の高い有機酸血症であるPCCとMMAが，新生児期に0.1ml尿を用いた簡易尿ウレアーゼ法¹⁾により確実に検出できるかどうかを，新生児スクリーニング試験研究成績やハイリスク児の診断支援研究の実績などをもとに検討した。

研究対象および方法

PCCの4例：福井医科大，重松らがるろ紙尿のタンデムマスにより発見した無症状のPCC 28生日児（症例1），重症で後に肝移植をうけた7生日児（症例2），ある施設で0.1ml尿，TMS誘導体という条件では診断できないと判定された14生日児（症例3）と7生日児（症例4）の4症例，および，日令の近い対照児の尿を用いた。

MMAの2例：簡易尿ウレアーゼ法を用いた新生児マススクリーニング試験研究²⁾で発見された低～中等度のメチルマロン酸高排泄者2例（現在も無症状）

について追跡した。

研究結果および考察

スキーム1に示すようにこの前処理法ではクレアチニンも回収されるので尿中代謝物の濃度の評価が適切に行える。図1に症例2の同一尿試料についてウレアーゼ法と有機溶媒抽出法を比較したクロマトグラムを示した。PCCの指標物質であるメチルクエン酸ジアステレオマー1, 2のSD異常度（mean + nSDにおけるn値）は症例1の28生日の無症状児でも37, 32と大きく，メチルクエン酸が発症前でも著明に増加していることがわかった。症例2で1,600, 600と超異常度を示した。症例3, 4でそれぞれ，79, 125, 55, 103であった（図2）。羊水のメチルクエン酸を指標としてPCCの出生前診断ができることを合わせ考えると，試料調製やGC/MS conditioning に問題がなければ新生児期に0.1ml尿，TMS化での簡易尿ウレアーゼ法により発症前のPCCをほぼ確実に検出できるものと推定される。

この簡易尿ウレアーゼ法を用いて行った新生児マススクリーニング試験研究成績でMMA 2例（低～中等度の高排泄者で現在も無症状）が発見された。この2名のメチルマロン酸排泄量の経過を追跡したところ，0.16～1.7，および0.5～3 mol/mol Creであり，対照との比較は明白であった。

一方、175万人を対象としたケベックでの尿による試験成績（1975年より）からMMAの発生率は8.3万人に1人、1.4 mol/mol Cre以下の無症状の低～中等度MMA高排泄者は5万人に1人で、0.2～1.1 mol/mol Cre で経過したことが報告されている³。

このことから、簡易ウレアーゼ法でも無症状を含む低～中等度の高排泄者を見落とさないこと、発症の確率が高いMMAは最初からその濃度がかなり高く、偽陰性となる可能性は殆どないと推定される。久留米大学、島根医科大学、千葉県こども病院を含めた4試験機関全体では1月末で3.3万人を分析し、尿素回路異常症2例など重要な疾患が発見されている。また、MMA高排泄者の発見率は1/1.7万人であった。

我が国においてろ紙血のタンデムマスを用いた重松らによる4万人を対象としたスクリーニング成績の発見例はPPCの1例である⁴。簡易尿ウレアーゼ法の発見率はテクニカルには金沢医科大も含めて改善の余地があることを考慮するとこれより向上するものと考えられ、心身障害発症予防に有効な方法と確信している。

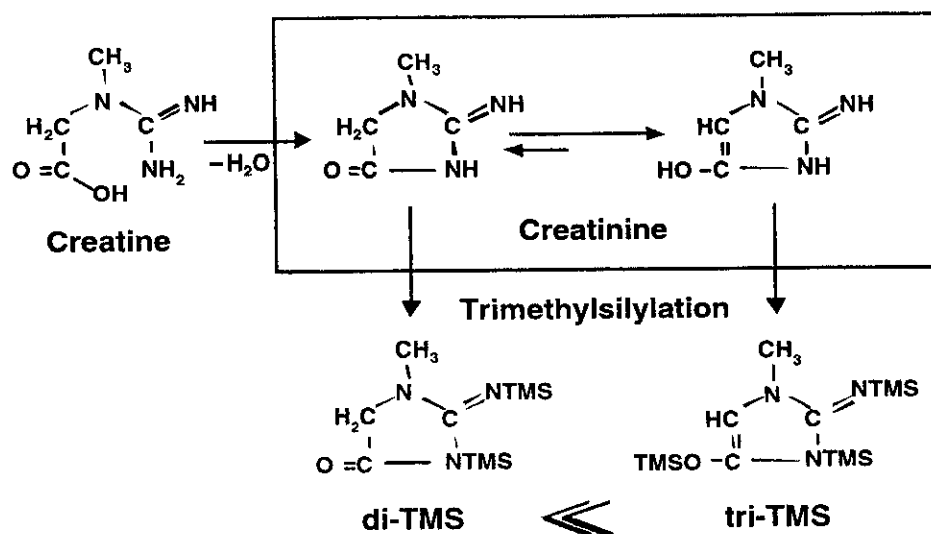
謝辞

MMA高排泄者1例の追跡調査にご協力頂きました

金沢医科大学 高橋弘昭教授、柿沼宏明助教授に御礼申し上げます。

文献

1. I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 15: 43-57 (1996)
2. T. Kuhara et al: Pilot study of gaschromatography-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J. Chromatogr. B*, 731: 141-147 (1999)
3. Sniderman LC et al: Outcome of individuals with low-moderate methylmalonic aciduria detected through a neonatal screening program. *J. Pediatr.* 134: 675-680 (1999)
4. 重松陽介: ESI-MS/MSによる新生児代謝異常マスキング-パイロットスタディ地域の拡大と患者検体分析による知見の蓄積-平成11年度厚生科学研究-マスキングの見逃し等を予防するシステムの確立に関する研究-研究班全体会議. 2000. 2. 12



Scheme 1 Determination of urinary creatinine using a stable isotope-labelled internal standard.

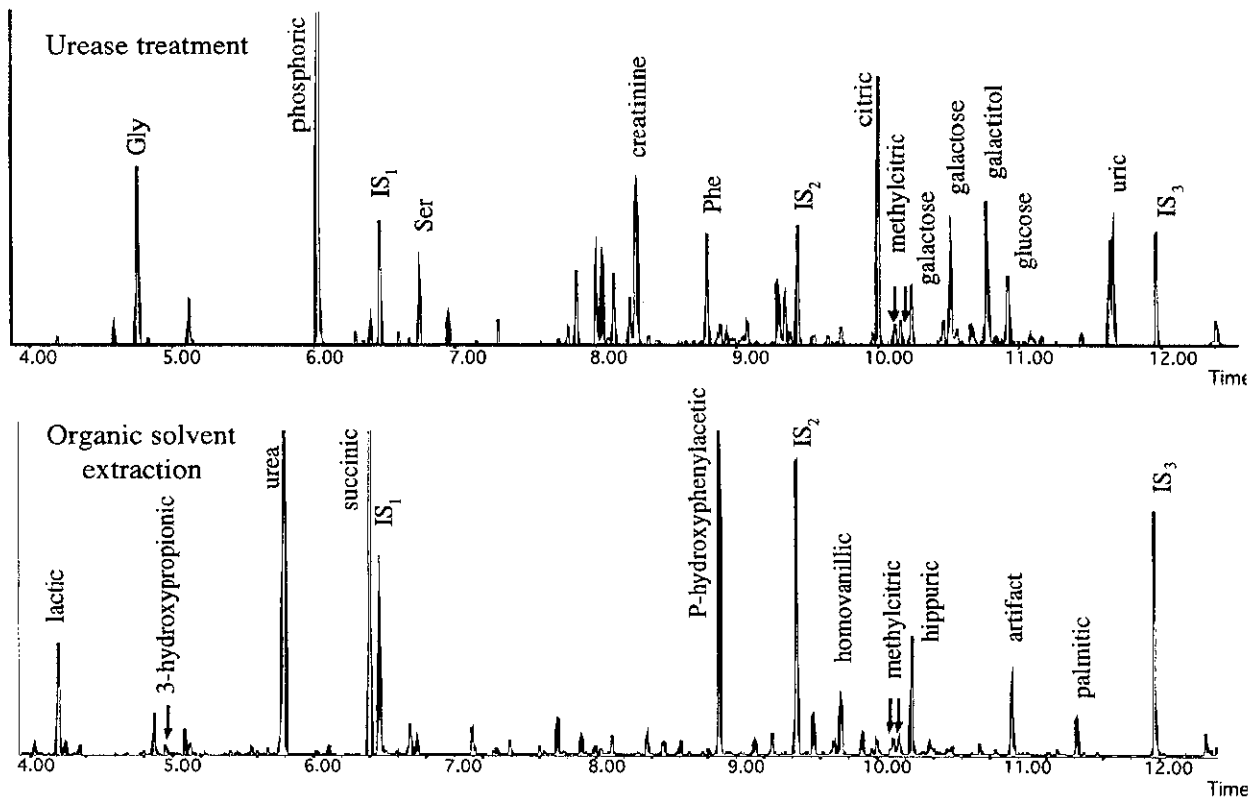


Fig. 1 GC/MS analysis of TMS derivatives of urinary metabolites from a 28-days-old asymptomatic propionic acidemia patient. The urine sample was kindly given from Prof. Shigematsu.

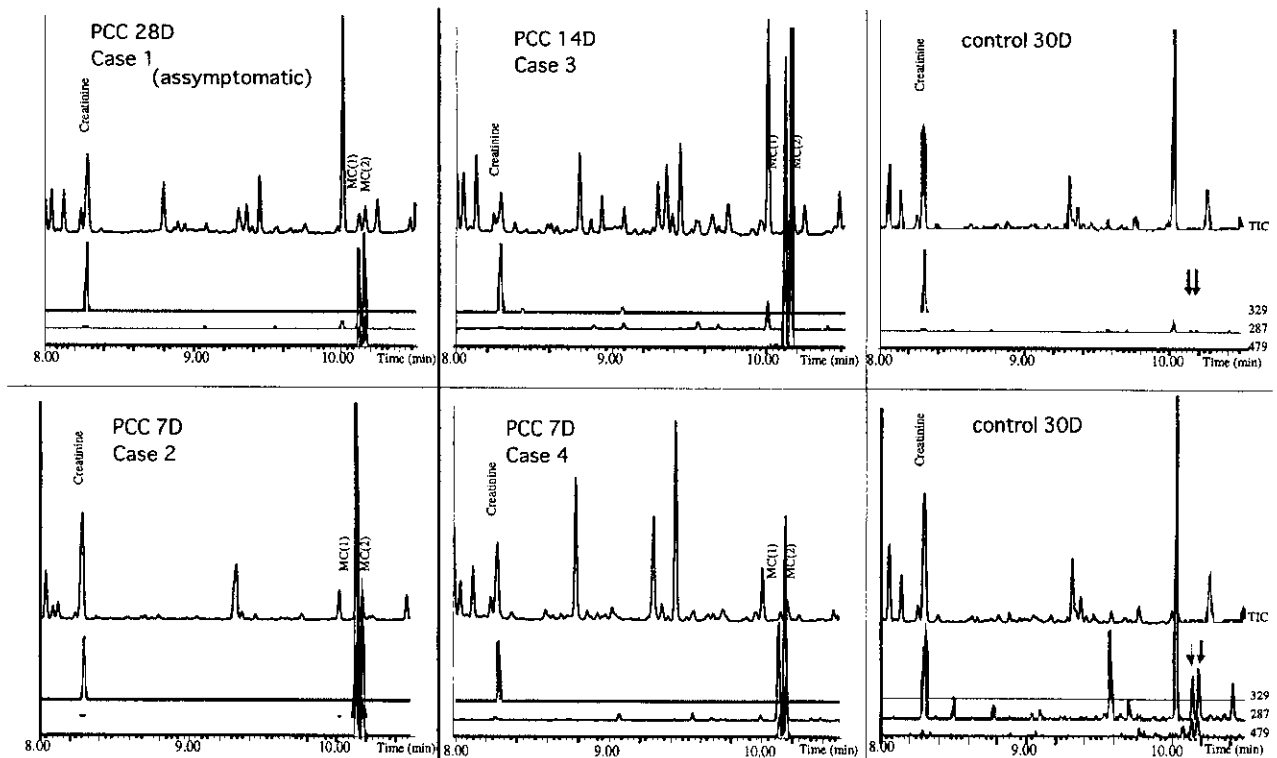


Fig. 2 TIC & mass chromatograms of four cases with propionic acidemia (PCC)

MC: methylcitrate – TIC $\times 0.1$ – m/z 329 $\times 1$ – m/z 287 $\times 4$ – m/z 479 $\times 7$

Partly reduced (1/25) scale for control is also shown (lower).

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

試験研究により、明らかになったGC/MS新生児代謝異常スクリーニングの長所と短所

研究要旨

現在、ガスリー法にかわる新生児代謝異常スクリーニングとして質量分析法による試験研究が国の内外で施行されている。我々は、ガスクロマト/質量分析法による試験研究を1996年1月から1999年12月までの期間に16733名の新生児を対象に施行し、シトルリン血症1名、グリセロールキナーゼ欠損症1名、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症1名、2-ケトアジピン酸尿症2名、神経芽細胞腫2名を発見することができた。他にも一過性チロジン血症を含む新生児期の一過性代謝異常を検出することができ、GC/MS法の有用性を証明することができた。しかし、血中のガラクトースやアミノ酸上昇が見られない場合でも、尿中のガラクトース、ガラクトール、アミノ酸の増加がみられることがあり、尿をもちいるGC/MSスクリーニングが疾患によってはスクリーニング手段としては、不適切であると考えられた。また本法で神経芽細胞腫も発見されることが、実証されたが、新生児期の発見される神経芽細胞腫が多くの場合、予後良好であることを考慮すると、神経芽細胞腫を対象疾患とすることには疑義がある。このようなGC/MSスクリーニングの長所と短所をよく認識し、対象疾患をよく検討し、限定すれば、GC/MSによるスクリーニングにより、大きな成果をあげることができるものと考えられた。

研究協力者

吉田一郎，城後美佐，田代さとみ，田代恭子，
青木久美子，猪口隆洋，田中正敏
(久留米大学医学部GC/MS医学
応用研究施設、同小児科)
廣瀬伸一 (福岡大学医学部小児科)

研究目的

新生児の尿をもちいて、ガスクロマト/質量分析法（以下GC/MS法）による代謝異常スクリーニングを施行した。このスクリーニングで発見された代謝異常につき、スクリーニングする意味があるかどうかも含めて、GC/MS法の長所および短所について検討した。

研究方法

- 1) 新生児16733名につき、主に5～7生日の尿をもちいて、代謝異常の有無についてスクリーニングを施行した。採尿の対象とした地域は福岡県が主であるが佐賀県、大分県の一部も含んでいる。
- 2) 方法はShoemakerらの方法を松本らが、改良したウレアーゼ法を用いた。

研究結果

新生児16733名中、シトルリン血症1名、グリセロールキナーゼ欠損症1名、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症1名、2-ケトアジピン酸尿症2

名、神経芽細胞腫2名、一過性高チロジン血症18名が発見された。一過性高チロジン血症以外の一過性代謝異常では3-ヒドロキシ酪酸の増加が32例、乳酸の増加が31例、HVA、VMAの増加が9例、ガラクトースの増加が16例、シスチンの増加が8名であった。これらの一過性代謝異常はその後のフォローにより、全例で正常化が観察された。臨床症状発現と尿の採取時期の関係ではシトルリン血症を除き、他はすべて無症状期での採尿であった。低クレアチニン尿による再検率では16733検体中、低クレアチニン検体数は20検体で再検率は0.12%であった。シトルリン血症の患児は新生児期に死亡、グリセロールキナーゼ欠損症は精神運動発達遅滞が出現、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損患児は奇跡的な救命のあと、順調に経過、2-ケトアジピン酸尿症2名は無症状で経過、神経芽細胞腫は2名のうち、1名は厚生省乳児神経芽細胞腫治療のプロトコールにもとづき、開腹し腫瘍除去後の経過は順調、他の1名は無治療での経過観察で自然退縮が観察された。一過性チロジン血症のなかには、血中チロジン値が28mg/dlと異常高値を示す患児が含まれており、高チロジン血症自体で脳障害の可能性が考えられたため、アスコルビン酸と治療ミルクで治療し、経過は順調である。尿中物質を尿中クレアチニン濃度で示すと、見かけ上の高値を示すことになるが、低クレアチニン値を3mg/dl以下とした場合の0.12%と再検率は低く、その他、尿の便による汚染などでの再検

もなかった。再検したのはクレアチニン低濃度以外には上述の一過性代謝異常の場合のみであった。

考察

今回のわれわれのスクリーニングでは総検体数が16733名と少なく、これだけの経験では、厳密な意味ではGC/MS法によるスクリーニングの長所や問題点を抽出することはできないが、それでも今までのスクリーニングで、いくつかの長所や短所が明らかになった。長所について述べると、1) 予想以上に多くの疾患が発見できること、2) ガスリーテストやMS/MS法では検出できない物質たとえばメチルマロン酸やグリセロール、オロト酸、ウラシル、メチルクエン酸、4-ヒドロキシフェニル乳酸、乳酸などスクリーニング診断上、極めて重要なマーカー物質を検出、測定できることで、実際に、これらの診断マーカーにより、上述の疾患が発見されていること、3) 代謝異常以外ファクターによる再検率が低いこと、4) 尿という非侵襲的なサンプルでスクリーニングができることなどである。短所については1) 検査に要する時間がMS/MS法に比較して長いこと、MS/MS法では測定時間が2~3分であるが、GC/MS法では15分を要すること、2) コストが高いこと、参考までに米国ではGC/MS法での料金が100ドル前後であるのに、MS/MS法では25~40ドルである。ただし、ハード面の経費すなわち分析機器のコストはMS/MS法のほうが、はるかに高額である。3) 尿というサンプルの限界があり、新生児期での生理的なアミノ酸尿や糖尿を陽性としてしまう問題があり、例えば最初にシスチン尿症が疑われた8名はその後のフォローで、全例で正常化が観察されているし、血中でガラクトースの上昇のない場合でも尿中でガラクトースやガラクトールの増加がみられることから、シスチン尿症やガラクトース血症を対象疾患にすることには問題があろう。ただし、ガラクトース血症では、血液ろ紙によるガスリーテストで疑陽性の判断のもと、外来を受診する新生児があとを絶たないことは周知のことである。より正確なスクリーニング法の開発が望まれよう。また、MS/MS法では測定時間が短く、コストも安価で、国際的にはガスリーテストにかわる手段として、期待されているが、正確性の点では大きな疑念

があること、MS/MSの主な対象疾患が中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症とフェニルケトン尿症であるが、前者は我が国では存在しない疾患であることや、フェニルケトン尿症でもかなりの患者を見逃している可能性があることは昨年の報告書で指摘したとおりである(文献1)。また高フェニルアラニン血症の患児の10生日での血液ろ紙でガスリーテストではフェニルアラニン濃度が10mg/dlであったのに、MS/MSでは6.7mg/dlであったという報告もこれを裏付けるものである(文献2)。Rashed (personal communication) によれば、MS/MSで最も正確に測定できる物質がフェニルアラニンであるとのことであるので、他の物質に関しては、どの程度、正確に測定できるかという基礎的検討が必要であろう。またアシルカルニチンは低カルニチン血症があれば、検出しにくいことや、新生児の授乳状態がよいほど、見逃されやすくなるという欠点もある。一方、GC/MSによる尿のスクリーニングではMS/MSに比較して、感度がよく、多くの代謝物質が容易に検出、測定されるが、今後はGC/MS法の方が他の方法より、正確に診断でき、治療も確立しているメチルマロン酸血症やオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症などのような対象疾患を慎重に選択すれば、有効なスクリーニングが可能となるものと考えられる。ただし、尿ではクレチン症のような重要な疾患をスクリーニングすることはできないので、GC/MS法が血液ろ紙にとってかわることはできない。また新生児神経芽細胞腫や2-ケトアジピン酸尿のような疾患は治療と予後の関係が不明で、どこまで、スクリーニングする意味があるかあるのか疑問があり、対象から除外することも含め、検討が必要であろう。

文献

1. 吉田一郎他：GC/MSによる新生児先天性代謝異常症のスクリーニング—3年間の経験—平成10年度厚生科学研究(子ども家庭総合研究事業)報告書
2. 山口清次他：GC/MSを用いた代謝異常スクリーニング：効果的な新生児マススクリーニング支援。平成10年度厚生科学研究(子ども家庭総合研究事業)報告書

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

有機酸代謝異常症の全国調査

研究要旨

先天性有機酸代謝異常症のマススクリーニングの有効性を検討するためには、疾患の負担の評価がきわめて重要である。このためにアンケート調査により全国の患者数の集計を行った。その結果メチルマロン酸血症65, プロピオン酸血症30症例, ホロカルボキシラーゼ欠損症10, 高乳酸血症152, その他37症例の報告があった。集計結果から計算される疾患発生頻度はそれぞれ、メチルマロン酸血症6.18名/100万人, プロピオン酸血症2.15名/100万人, 高乳酸血症13.44名/100万人と考えられた。今回の調査より漏れている患者, さらに見のがされている患者も多いものと考えられ, 有機酸代謝異常症の国民に対する疾患負担はきわめて大きいものと考えられた。

研究協力者

高柳正樹 (千葉県こども病院小児科)

研究目的

われわれはこれまで新生児の尿を用いて、先天性有機酸代謝異常症のマススクリーニングの可能性について検討を加えてきた。特にスクリーニングの有効性については各種の検討を行い報告している。有効性の評価には疾患の負担の評価がきわめて重要であり、疾患の発生頻度ならびに予後についての情報が求められる。わが国におけるこれらについての情報は少なく、昭和60年の多田らの報告が最後である。最近の有機酸代謝異常症に体する理解と、検査機器の進歩は急速なものがある。このため今回最近の本邦における有機酸代謝異常症の実態を把握する目的で全国調査を行った。

研究方法

1990年より1999年11月までに経験した先天性有機酸代謝異常症を調査するために、調査依頼表を全国の医療機関に送付した。送付先は全国の大学病院などの医育機関、小児専門医療機関および300床以上で小児科を標榜している病院、合計639施設である。調査内容は疾患名、性別、生年、イニシャル、生命予後である。今回の調査ではアミノ酸代謝異常症にともなうものや糖原病に見られるような二次的なものは対象から除外した。

研究結果

依頼した639施設のうち396施設より回答があった。回答率は62%であった。回答のあった396施設のうち、何らかの有機酸代謝異常症の症例を経験した施設は101施設であり回答のあった施設の約26%

であった。

1) 疾患別患者数：

疾患別の集計表を表1に示した。メチルマロン酸血症は65症例（男32, 女33）、プロピオン酸血症は30症例（男9, 女21）、ホロカルボキシラーゼ欠損症は10症例（男3, 女7）であった。そのほかイソ吉草酸血症4症例、グルタル酸尿症II型4症例などの報告数が多かった。高乳酸血症は合計152症例の報告があった。診断名については原則的に報告された病名をそのまま使用したので、分類に不十分などところがあるが、いわゆるミトコンドリア脳筋症といわれている疾患群に含まれるものが多く報告された。そのほかピルビン酸脱水素酵素複合体の異常症に含まれる疾患も多く報告されている。今回の報告で特記すべきは脂肪酸代謝異常症の症例が数は少ないものの報告されていることである。

表1に多田らの報告の症例数も同時に記載した。多田らの調査の方法はわれわれのものとは多少異なるが、回答率も70%とほぼ同じである。全体の症例数は147症例から294症例と2倍以上の増多を示している。ことに高乳酸血症が66症例から151症例と大きく増多している。

2) 生命予後：

表1に生死についての調査結果を示した。同時に多田らの調査における結果も並記した。明らかにメチルマロン酸血症における生命予後については改善が認められている。プロピオン酸血症についてはその生命予後は今回も不良であった。高乳酸血症は診断分類が多田らの調査と大きく異なるので合計数のみ記載したが、生命予後の改善は認められない。報告された症例全体の死亡率は30%ときわめて高い。

3) 年時別発生頻度：

年次別発生頻度を代表的な疾患である、メチル

マロン酸血症，プロピオン酸血症，高乳酸血症について図1に示す。最近5年間でいずれの疾患も報告数が増多していた。

4) 地域別患者数：

メチルマロン酸血症合計65症例の報告があった。各地方より各々、北海道0、東北8、関東15、中部4、近畿15、中国・四国9、九州14症例とほぼ全国からの報告が見られた。このほかの疾患においても地域的な症例の偏在は認められなかった。

考察

15年前の多田らの報告に比べ、報告数が増多していることより、発見される先天性有機酸代謝異常症の症例は増多しているものと考えられた。なかでも高乳酸血症の際立った増多は、ミトコンドリア病にたいする理解が急速に進んだためと思われた。

年間の発生率を検討するため、最近5年間（1995-1999）の症例の集計を行った。メチルマロン酸血症4.6名/年，プロピオン酸血症1.6名/年，高乳酸血症 10.0名/年の発生率であった。これにアンケート回収率，全国の出生数などで

補正するとメチルマロン酸血症6.18名/100万人，プロピオン酸血症2.15名/100万人，高乳酸血症13.44名/100万人の疾患発生頻度と考えられた。

他の報告と比べ明らかに報告数の少ない疾患もあるので、今回の調査によっても多くの症例が集計もれになっていると思われる。おそらく本当の発生頻度はこれよりも高いものと考えられた。

今回の集計でも死亡率はきわめて高く、死亡にいたらないまでも重篤な心身障害を残している患者が多く存在するものと思われる。この点からみても有機酸代謝障害症はおおきな疾患負担を国民に与えているものと考えられた。

結論

先天性の有機酸代謝異常症の発生頻度は、各疾患を合せると少なくとも2名/10万人以上と考えられ、その疾患負担はきわめて大きいものと考えられた。また疾患の発見の遅れによる疾患の重篤化も考え合わせて、この先天性有機酸代謝異常症をスクリーニングし発症以前に早期発見することは、きわめて有効であると考えられた。

図 1

